

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



X-53-366918-8

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
EXOPOLIGALACTURONASA DE *Fusarium oxysporum*
f.sp. *radicis lycopersici*.

TESIS DOCTORAL
POR
BELÉN PATIÑO ALVAREZ

DIRECTORA:
Dra. COVADONGA VÁZQUEZ ESTÉVEZ

MADRID, 1998

23066



BIBLIOTECA

“Grupos increíblemente pequeños de átomos,
demasiado pequeños para poder cumplir leyes estadísticas exactas,
juegan un papel predominante en los estrictamente regulados y
ordenados acontecimientos de un ser vivo”.

Erwin Schrödinger, 1945.

A ti abuelo,
porque sé que ahí donde estás,
sigues sintiéndote orgulloso de mí.
El trabajo de esta tesis te lo dedico
con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología III, de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, que dirige el Dr. José Martínez Peinado a quién quiero agradecer el haberme permitido realizar la tesis en este Departamento. Así mismo quiero agradecerle su apoyo cuando lo he necesitado, sus consejos siempre útiles y el saber elegir gente tan estupenda para que fuesen mis compañeros en el laboratorio 8 .

Quiero expresar mi profunda gratitud a la Dra. Covadonga Vázquez Estévez, mi directora de tesis, por la cantidad de tiempo que ha dedicado a enseñarme muchas más cosas que las técnicas que están incluidas en este trabajo, por saber dirigir como nadie y por hacerme sentir que he tenido una gran suerte al trabajar con ella. Y a “Cova”, por consolarme en los momentos difíciles, por compartir mi alegría en los buenos momentos, por llevarme a los congresos (que son la parte divertida de la investigación) y por estar siempre preocupada por mi futuro.

A la Dra. Josefina Rodríguez de Lecea, por resolverme todas las dudas burocráticas del doctorado (que han sido muchas) y por ayudarme siempre. A través de ella quiero dar las gracias a la SEM (Sociedad Española de Microbiología) por haberme ayudado económicamente siempre que lo he necesitado, sobre todo antes de conseguir la beca financiándome mis primeros congresos y mi estancia en Roma. Gracias tanto a Josefina como a la SEM por esa inestimable ayuda.

A la Dra. M^a Jesús Martínez del CIB, por la infinidad de horas que me ha dedicado, por sus consejos y porque gran parte de este trabajo ha sido posible gracias a su ayuda y a la de las chicas y chicos (Carmen, Elisa, Marta, Susana, Javi, Victor, Paco..) de su laboratorio que han aguantado pacientemente mis preguntas y el que acaparase el HPLC durante días. Y a Patricia, que ya no sé bien dentro de que grupo de gente ponerla, por empezar conmigo en esto de la ciencia y acompañarme siempre.

A las Dras. Pilar Estévez, Rosalía Ramírez y M^a Teresa Rodríguez del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la UCM y a las chicas que trabajan o han trabajado con ellas, por ayudarme todo lo que he necesitado durante estos años.

A la Dra. M^a Teresa González-Jaén y a Martha Lucía Posada, del Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la UCM porque la secuencia parcial del gen

se ha logrado gracias a ellas y por enseñarme a entender mejor toda esa parte de la Tesis que me parecía ciencia ficción.

Al Dr. Álvaro Martínez del Pozo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Químicas por estar siempre dispuesto a ayudar, por su consejo siempre que lo hemos necesitado, por enseñarme algunas de las técnicas utilizadas en esta Tesis y por su gran amabilidad.

Al Profesor Felice Cervone del “Dipartimento de Biologia Vegetale” de la Universidad “La Sapienza” de Roma, por acogerme en su laboratorio, permitirme realizar parte de este trabajo allí y tratarme realmente como a un miembro más de su equipo. A la Dra. Giulia de Lorenzo, a Gianni Salvi, a la Dra. Daniella Bellicampi y al Dr. Claudio Caprari por sus consejos y ayuda y a resto de las personas del laboratorio, especialmente a Alessandra, Benedetta, Vera y como no, Benedetto por hacerme sentir allí realmente como si estuviese en mi casa, por su cariño, por hacerme el trabajo realmente agradable y por conseguir que conociese y me enamorase profundamente de Roma y de la gente de allí. Siempre estaréis en mi corazón. ¡Gracias!.

Y ahora de vuelta a casa quiero agradecer su compañía a las personas que me han soportado en el laboratorio 8 durante años. A Alberto, el más antiguo del lugar, por saber de todo y compartirlo con los demás, eres una ayuda inestimable cuando alguien entra en un laboratorio, por hacerte sentir siempre bien y por ser de mi mismo equipo de fútbol (¡siempre es bueno tener a alguien que te apoye los lunes!). A Javi porque aunque al final sólo quedábamos los dos nos consolábamos mutuamente durante la escritura de la tesis y por compartir conmigo la pasión por el italiano. A Manolo, el “Dandi” del laboratorio, por saber escuchar y estar siempre ahí para que te pudieses desahogar con él. ¡Pronto seremos vecinos!. A Victor, que aunque ahora está en el CIB, para mí siempre será del 8, gracias por no protestar nunca por los innumerables artículos que me has tenido que traer de la biblioteca del CIB, por ser tan cariñoso y por no olvidarte de nosotros, a través de él le quiero dar las gracias a Asun por servirnos de enlace y no consentir que se rompiera nuestra amistad. A Pilar, por su vitalidad hace que te sientas bien sólo con verla y por sus arrebatos de genio que no vienen mal de vez en cuando. A Miguel Angel porque gracias a él no discuto con Rafa (o al menos eso es lo que él dice), por soportar mis broncas con una sonrisa y por acompañarme todos los días en el café. A mis niños del 7 (aunque en nuestro corazón son parte del 8), a Paco ser como es, es decir bueno, por ayudarme siempre que he necesitado algo y porque siempre sabe que hacer para pincharme. ¡Yo también creo que eres un buen jefe! y a Nacho, por sus ideas

felices, por proponerse una meta y no cesar hasta que no la consigue y por embarcarse en cualquier aventura nueva sin dudarlo. También les quiero dar las gracias a todas las chicas y chicos nuevos del 8 y del 2, porque me han hecho muchísima compañía durante estos meses y especialmente a Paula porque con sus preguntas me ha permitido cacharrear un poco en el laboratorio que es lo que más se echa de menos cuando escribes y porque sus ganas de trabajar me traen muy buenos recuerdos.

A las chicas del 19 porque a la hora que te fueses o que llegases ellas estaban aquí, y eso consuela. Lucía espero que tengas mucha suerte con tu niña. Y al resto de miembros del Departamento, porque todos sin excepción me han prestado su ayuda cuando lo he necesitado.

Y como en la vida no todo es el trabajo quiero dar la gracias también a mis amigos: a Gema porque ya son muchos años los que lleva aguantandome y compartiendo secretos conmigo, tu ya sabes que son muchas las cosas por las que te tengo que dar las gracias, a Marian ¡quien iba a imaginar en primero que ibas a ser una madraza y la más sensata del grupo!, a Viñas por no desanimarse nunca, a Arancha por ser siempre tan activa y vivir en tu mundo de fantasía, a Juan Carlos por ser un buen amigo y no protestar por nuestras reuniones “sólo chicas”. No me olvido de Cesar y Jaime que han soportado las conversaciones interminables de biología sin rechistar.

A mis primos Mario, Julián, Javi e Iván por animarme siempre, aunque a veces no entiendan muy bien por qué estoy haciendo esto y a mis pequeñajas, aunque ya no lo sean tanto, Blanca, Angela y M^a Teresa por lo mucho que me quieren, porque confían en mí y me hacen sentir importante. Y no se me olvidan los enanos, Rocío y Julián por la alegría que han dado otra vez a la casa. Y también a Eva, Ana y Marta, por todas las cosas que hemos compartido estos años.

A mis Tios, porque el saber que ellos estaban deseando que fuese doctora me ha ayudado a seguir y especialmente a mi abuela, por estar tan orgullosa de mí, por preocuparse siempre porque estemos bien y quererme tantísimo.

A Tere, mi hermana mayor, por no ser sólo una hermana, sino también una amiga, porque siempre me ha animado y porque me ha dado momentos muy felices estos años, ella junto con mi cuñado Manu, que también es un sol, me han hecho el mejor regalo que podían haberme hecho nunca, a mi sobrina. A Belén le quiero agradecer un año lleno de sonrisas y el que se te olviden todos los problemas sólo con mirarla.

Aunque suene a tópico realmente no tengo palabras para agradecer a mis padres todo lo que han hecho por mí estos años, este trabajo no hubiera sido posible sin su sacrificio y ayuda. Ellos siempre han tenido claro que lo que yo quería hacer era importante para mí y han hecho todo lo posible y lo imposible para que mi sueño, que a partir de ese momento era también el suyo, se hiciese realidad. Sois capaces de sacrificar cualquier cosa por vuestras hijas y eso tiene mucho mérito.

Y finalmente a Rafa, son tantas las cosas que tengo que agradecerte que no sé por donde empezar. Has aguantado esta tesis primero novio y luego como marido sin protestar, nunca te has quejado de mis interminables charlas de trabajo, y siempre me has apoyado, gracias por todo esto y por las horas que te he robado, sobre todos estos últimos meses, por estar siempre ahí, por tu paciencia infinita, porque contigo todo resulta fácil de alcanzar, por no presionarme nunca y respetar siempre mis decisiones (y no me refiero sólo a las de trabajo). Tú eres capaz de conseguir que siempre me sienta importante.

|

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS..... | 1 |
| I.-INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| I.1.- El género <i>Fusarium</i> | 3 |
| I.1.1.- <i>Fusarium oxysporum</i> | 6 |
| I.1.1.a - La fusariosis vascular causada por <i>Fusarium oxysporum</i> | 8 |
| I.1.1.b.- La podredumbre del cuello y la raíz..... | 10 |
| I.1.2.- <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i> | 10 |
| I.1.2.a.- Distribución..... | 10 |
| I.1.2.b.-Sintomatología de la "enfermedad de los invernaderos" causada por FORL..... | 11 |
| I.1.2.c.- Especificidad parasitaria..... | 14 |
| I.2.- La pared celular..... | 14 |
| I.2.1.- Pared celular primaria..... | 15 |
| I.2.2.- Pared celular tipo I..... | 15 |
| I.3 Enzimas degradadoras de la pared celular..... | 21 |
| I.3.1.- Tipos de enzimas pécticas..... | 23 |
| I.3.1.c. Enzimas pécticas..... | 24 |
| I.3.1.b.-Celulasas..... | 31 |
| I.3.1.c.-Enzimas que degradan la matriz neutra de polisacáridos..... | 32 |
| I.4.- El papel de las poligalacturonasas en la patogénesis..... | 32 |
| II. -MATERIALES Y MÉTODOS..... | 35 |
| II.1.- Origen y mantenimiento del hongo..... | 36 |
| II.2.- Cultivo de los hongos..... | 36 |
| II.2.1.-Medio inductor de pectinasas..... | 36 |
| II.2.2.- Preparación de inóculos..... | 36 |
| II.2.3.- Cultivo en medio inductor..... | 36 |
| II.3.-Determinaciones analíticas..... | 37 |
| II.3.1.-Peso seco del micelio..... | 37 |
| II.3.2.- pH..... | 37 |
| II.3.3.- Sustancias reductoras. Actividad poligalacturonasa..... | 37 |
| II.3.4.-Proteínas en el líquido de cultivo..... | 38 |
| II.3.5.- Valoración de la glucosa..... | 38 |
| II.3.6.- Soluciones tampón..... | 38 |
| II.4.-Métodos de concentración de proteínas..... | 39 |
| II.4.1.- Ultrafiltración..... | 39 |
| II.4.2.- Precipitación con ácido tánico..... | 39 |
| II.4.3.- Precipitación con sulfato amónico..... | 40 |
| II.4.4.- Precipitación con solventes orgánicos..... | 40 |
| II.5.- Diálisis..... | 40 |
| II.6.- Técnicas cromatográficas..... | 40 |
| I.6.1.- Cromatografía líquida..... | 40 |
| II.6.1.1.- Exclusión molecular..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| II.6.1.2.- Intercambio iónico..... | 41 |
| II.6.2.- Cromatografía en capa fina..... | 42 |
| II.7.- Técnicas electroforéticas..... | 42 |
| II.7.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida..... | 42 |
| II.7.2.- Isoelectroenfoque analítico..... | 42 |
| II.7.3.- Electroelución..... | 43 |
| II.8.- Métodos de tinción..... | 44 |
| II.8.1.- Tinción de proteínas..... | 44 |
| II.8.2.- Tinción de actividad por incubación en el sustrato..... | 45 |
| II.9.- Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa..... | 45 |
| II.10.- Caracterización de la poligalacturonasa..... | 46 |
| II.10.1.- Determinación de la naturaleza glicoproteica de la proteína..... | 46 |
| II.10.2.- Contenido en carbohidratos..... | 46 |
| II.10.3.- Desglicosilación..... | 47 |
| II.10.4.- Determinación del amino terminal de la proteína..... | 47 |
| II.10.5.- Determinación de la secuencia de un péptido interno de la poligalacturonasa..... | 47 |
| II.10.6.- Análisis de aminoácidos..... | 48 |
| II.11.- Obtención de una sonda para la enzima exopoligalacturonasa..... | 48 |
| II.12.- Secuenciación y análisis de secuencias..... | 49 |
| II.13.- Obtención de anticuerpos policlonales frente a la poligalacturonasa..... | 49 |
| II.14.- Inmunodetección de la poligalacturonasa..... | 50 |
| II.15.- DT-IBA (direct tissue-blotted immunobinding assay)..... | 51 |
| II.16.- Inoculación de plantas de tomate..... | 51 |
| III.- RESULTADOS..... | 52 |
| III.1.- Determinación de las condiciones idóneas para el crecimiento del hongo y la producción de poligalacturonas..... | 53 |
| III.2.- Isoelectroenfoques analíticos..... | 56 |
| III.3.- Cromatografías en capa fina..... | 59 |
| III.3.1.- Degradación del digalacturónico y el trigalacturónico por las PGs producidas el día 2 y 6 de crecimiento sobre pectina..... | 61 |
| III.4.- Represión por glucosa de la poligalacturonasa..... | 63 |
| III.5.- Caracterización de la actividad exo-PG previa a su purificación..... | 65 |
| III.5.1.- pH óptimo..... | 65 |
| III.5.2.- Estabilidad al pH..... | 66 |
| III.5.3.- Temperatura óptima..... | 66 |
| III.5.4.- Estabilidad a la temperatura..... | 67 |
| III.5.5.- Afinidad por el ácido poligalacturónico..... | 67 |
| III.5.6.- Efecto de varios iones y compuestos en la actividad poligalacturonasa..... | 68 |
| III.6.- Purificación de la exopoligalacturonasa..... | 69 |
| III.6.1.- Concentración..... | 69 |
| III.6.2.- Cromatografía de exclusión molecular Bio-Gel P100..... | 70 |
| III.6.3.- Cromatografía en Mono-Q..... | 71 |
| III.6.4.- Resultado global del proceso de purificación..... | 72 |
| III.7.- Caracterización de la PG ₁ | 72 |

| | |
|--|------------|
| III.7.1.- Modo de acción..... | 73 |
| III.7.2.- Masa molecular..... | 73 |
| III.7.3.- Punto isoelectrico..... | 74 |
| III.7.4. pH óptimo..... | 74 |
| III.7.4.-Estabilidad frente al pH..... | 75 |
| III.7.5.- Temperatura óptima de la PG ₁ | 75 |
| III.7.6.- Estabilidad frente a la temperatura..... | 76 |
| III.7.7.- Afinidad por distintos sustratos de la exoPG..... | 76 |
| III.7.8.- Naturaleza glicoproteica de la proteína..... | 78 |
| III.7.9.- Contenido en carbohidratos..... | 78 |
| III.3.10.- Desglicosilación de la proteína..... | 78 |
| III.7.11.- Secuencia del amino terminal y de un péptido interno de la proteína | 79 |
| III.7.12.- Composición de aminoácidos..... | 80 |
| III.8.-Obtención de una sonda para la exo-PG..... | 80 |
| III.9.- Obtención de anticuerpos policlonales frente a la PG ₁ | 82 |
| III.9.1. Detección de la enzima en extractos procedentes del crecimiento en distintas fuentes de carbono..... | 83 |
| III.9.2.- Inmunodetección de la exoPG en planta infectada..... | 84 |
| III.10.- Ensayos con PGIPs (proteinas inhibidoras de la poligalacturonasa)..... | 86 |
| IV.- DISCUSIÓN..... | 88 |
| IV.1.- Determinación de las condiciones idóneas para el crecimiento del hongo y la producción de poligalacturonasas..... | 89 |
| IV.2.- Isoelectroenfocos analíticos..... | 92 |
| IV.3.- Cromatografías en capa fina..... | 95 |
| IV.3.1.-Degradación del digalacturónico y el trigalacturónico por las PGs producidas el día 2 y 6 de crecimiento sobre pectina..... | 97 |
| IV.4.- Represión por glucosa de la poligalacturonasa..... | 98 |
| IV.5.- Caracterización de la exoPG previa a su purificación..... | 100 |
| IV.6.- Purificación de la exopoligalacturonasa..... | 102 |
| IV.7.- Caracterización de la PG ₁ | 104 |
| IV.8.- Obtención de una sonda para la exoPG..... | 108 |
| IV.9.- Obtención de anticuerpos policlonales frente a la PG ₁ | 110 |
| IV.10.- Ensayos con proteínas inhibidoras de la poligalacturonasa..... | 111 |
| IV.11.- Evidencias de la implicación de las poligalacturonasas en la patogénesis..... | 113 |
| V.- CONCLUSIONES..... | 118 |
| VI.- BIBLIOGRAFÍA..... | 121 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| CWDE | enzimas que degradan la pared celular |
| DAB | tetrahidroclorato de 2',3'diaminabencidina |
| DEAE | dietilaminoetil |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| endo-H | endo- β -N acetilglucosaminidasa H |
| endoPG | endopoligalacturonasa |
| exoPG | exopoligalacturonasa |
| FOL | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> |
| FORL | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> |
| GRP | proteínas ricas en glicina |
| HRGPs | glicoproteínas ricas en hidroxiprolina |
| IEF | isoelectroenfoque |
| LB | bacto-triptona +extracto de bactolevadura+cloruro sódico |
| LBA | LB+ ampicilina |
| NaN ₃ | azida sódica |
| PAGE-SDS | electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS |
| PBS | tampón fosfato salino |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PDA | agar patata dextrosa |
| PE | pectinesterasa |
| PG | poligalacturonasa |
| pI | punto isoeléctrico |
| PRPs | proteínas ricas en prolina |
| PTH | feniltiohidantoina |
| RNAsa | ribonucleasa |
| SDS | dodecil-sulfato sódico |
| TBS | tampón TRIS salino |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina |
| TRIS | Tris-(hidroximetil)-aminometano |
| UAE | unidad de actividad enzimática |

INTRODUCCIÓN

I.1.- EL GÉNERO *Fusarium*.

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link quien lo definió como especies de forma hialina, con esporas no septadas que nacían en un estroma. Esta descripción se hizo basándose en las observaciones de *F.roseum*, primera especie descrita y debido a su falta de especificidad, se podría aplicar al menos a 50 géneros diferentes de Hyphomycetes. El género fue validado por Fries (1821) quien lo incluyó en el orden Tuberculariaceae. Actualmente, con el desarrollo nuevos métodos de identificación, esta definición ha sufrido una serie de modificaciones quedando como: “especies con macroconidios fusoides, ligeramente curvados, septados y con una célula basal pedicelada” (Booth, 1971). Los microconidios y clamidosporas, terminales o intercalares, pueden estar ausentes o presentes .

En los pasados 10 años se ha intentado lograr una uniformidad en lo que a la sistemática de *Fusarium* se refiere, y aunque se ha avanzado considerablemente, todavía existen desacuerdos entre los diferentes estados (Liddell, 1991). Esto no es normal que ocurra en micología, en este caso las dificultades provienen de que las especies de *Fusarium* interesan a un gran número de científicos y tecnólogos con escasa formación en micología, que sin embargo necesitan una manera rápida para identificar este género.

El género *Fusarium* comprende un grupo de hongos muy variado y cosmopolita (se han aislado especies tanto en el círculo polar Ártico, como en la arena del Sahara), es responsable de numerosas enfermedades de plantas, incluyendo marchitamientos, podredumbres, chancros (crankers), etc., en gran variedad de especies vegetales (Booth, 1971, 1984), también es responsable de problemas durante el almacenamiento de vegetales, alteraciones de cosechas, ya se empezaron a describir casos de podredumbres de patatas almacenadas en 1842.

Entre los efectos que causa *Fusarium* en humanos y animales, se encuentran las micosis producidas en nariz y ojos y las úlceras, a la vez que es capaz de producir toxinas que causan enfermedad o incluso la muerte en los mismos. La producción de toxinas se empezó a describir en 1890 cuando en Nebraska caballos, cerdos y vacas alimentados con grano infectado perdían el pelo. Las micotoxicosis son

envenenamientos causados por la ingestión de toxinas fungicas de que se encuentran en alimentos alterados o dañados por el crecimiento de hongos toxigénicos. Las toxinas entran en el animal o en el hombre por ingestión, inhalación, o contacto directo a través de la piel y son suficientes cantidades mínimas de la misma para producir cambios significativos en la salud del animal afectado. A altas concentraciones pueden provocar síntomas agudos o la muerte y a bajas concentraciones tienen efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos o estrogénicos. Algunas de las micotoxinas que pueden ser identificadas como toxinas de *Fusarium* son: la toxina alimentaria aleukia, la zearalenona y el deoxynivalenol. Estas dos últimas se encuentran frecuentemente en granos de cereales y son quizás el mejor ejemplo de micotoxinas que afectan a animales de granja, sus síntomas son hiperestrogenismo e infertilidad.

El género *Fusarium* comprende alrededor de 40 especies, que a su vez están agrupadas en 12 secciones. Cada sección es en realidad un conjunto de especies relacionadas entre sí, más de la mitad de las especies son parásitas de plantas. Booth (1971) divide las 43 especies en cuatro grupos principales: patógenos de plantas, patógenos de insectos, saprófitos y habitantes de suelo. De ellos, unas pocas especies son capaces de hacer de puente entre los 4 grupos, es decir, atacan plantas, insectos o son capaces de vivir activamente fuera del hospedador. De las 43, 27 especies son patógenas de plantas verdes y entre ellos se encuentran alguno de los más serios patógenos del mundo agrícola. Los patógenos pueden serlo de un amplio rango de especies, o de una sola, inclusive de un solo cultivar. Además pueden comportarse como patógenos o vivir como saprófitos en el suelo hasta que las condiciones para su desarrollo como patógeno sean las idóneas. Esta amplia gama de relaciones entre el patógeno y el o los hospedadores hace que surjan términos como raza fisiológica o forma especial, que aunque no están incluidos en los códigos internacionales de nomenclatura nos ayudan a describir el grado de especificidad de la relación hospedador-patógeno.

Una raza fisiológica se define en término de genes de resistencia en el hospedador y esto según la teoría de Flor (1956), gen por gen significa un número comparable de genes de avirulencia/virulencia en el hongo, Es decir para n genes de resistencia en el hospedador, existirían 2^n razas fisiológicas en el patógeno. Poco se

conoce acerca del origen espontáneo de nuevas razas de *Fusarium* en la naturaleza, salvo que surgen irregular e impredeciblemente. Estas razas también pueden producirse por mutágenos (Bonhot, 1981).

Las formas especiales (Deighton *et al.*, 1962), son cepas morfológicamente muy similares, que se caracterizan por su adaptación a diferentes hospedadores, serían por lo tanto un conjunto de cepas que atacan a una especie vegetal o a lo sumo a varias especies de un mismo género.

Tanto las formas especiales como las razas fisiológicas no son reconocibles morfológicamente, solo la inoculación y su comportamiento frente al hospedador, permiten su identificación.

Entre los fitopatólogos es conocido este género, tanto por los daños que ocasiona como por la dificultad que presenta su identificación debido a la gran variabilidad morfológica y fisiológica, que las especies pertenecientes a este género experimentan frente a cualquier cambio ambiental (Booth, 1978). Este autor afirmó que no existe ningún misterio en la taxonomía de *Fusarium*, pero que si buscamos problemas, los cultivos de *Fusarium* son los candidatos ideales para crearlos. *Fusarium* puede adaptarse a un amplio rango de sustratos, mediante cambios morfológicos, por ejemplo la relación carbono/nitrógeno del medio puede influir en la longitud, forma, y septado de las esporas e incluso a la pigmentación del medio y de las colonias. La simple transferencia de un cultivo viejo a diferentes medios de cultivo, nos puede hacer pensar que estamos ante una contaminación.

La mayoría de las enfermedades causadas en plantas por *Fusarium* tienen un difícil control. Se han utilizado métodos químicos, físicos, biológicos y genéticos, con diferentes niveles de éxito. En la mayoría de los casos, no se evita el desarrollo de la enfermedad con un único método, sino con la unión de varios de ellos.

Dentro de *Fusarium* las especies que son patógenos de plantas se pueden dividir en tres grupos principales: Los que provocan marchitamientos cuyo principal representante es *F. oxysporum*, los que atacan a gramíneas, principalmente *F.*

moniliforme, *F. graminearum*, *F. avenaceum* y *F. culmorum* y los que provocan podredumbres de la raíz de las plantas, entre los que se encuentra *F. solani*. Cada uno de los grupos tiene factores en común con los otros, como la capacidad de sobrevivir en ausencia de hospedador (Price, 1984). Las poblaciones de *Fusarium* pueden sobrevivir como clamidosporas y sólo si hay restos de semillas o residuos de plantas se desarrollarán como micelio (Snyder, 1969).

I.1.1- *Fusarium oxysporum*.

De las 12 secciones que se incluyen en el género *Fusarium* (Booth, 1971), *Fusarium oxysporum* es el principal representante (para algunos autores, el único) de la sección Elegans. Es un hongo cosmopolita, con múltiples formas especializadas patógenas, parasita alrededor de 100 especies de plantas, incluyendo gimnospermas y angiospermas (Armstrong y Armstrong, 1981).

Fusarium oxysporum pertenece a los “fungi imperfecti”, que incluye hongos (aproximadamente 300.000 especies) en los que no se conoce la reproducción sexual, bien porque nunca ha sido observada, porque nunca la han poseído o porque la han perdido. En ellos sólo se conocen procesos de multiplicación vegetativa por conidios. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos patógenos de plantas.

Aparte de ser el miembro más importante, económicamente, del género *Fusarium*, es también uno de los más variables. Las estirpes parásitas son indistinguibles morfológicamente de las saprófitas, pero muestran diferentes habilidades para parasitar hospedadores específicos (Booth, 1971).

Fusarium oxysporum es en primer lugar, y predominantemente, un saprófito abundante del suelo y la materia orgánica. Además algunas cepas tienen una actividad patogénica específica, que aunque constituyen una porción muy pequeña dentro de la población total del suelo, causan enfermedades muy importantes en los cultivos. Dentro de *F. oxysporum*, el grado de restricción a un solo hospedador varía, algunas cepas están poco especializadas y causan la muerte de plántulas, necrosis y podredumbres, mientras otras son parásitas a una única especie, o incluso a un único cultivar; por ejemplo, *F.*

oxysporum f.sp. *lycopersici* está restringido al género *lycopersicon*, mientras que *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* se ha encontrado en *Cajanus*, *Coffea*, *Glycine*, *Gossypium*, *Hevea*, *Hibiscus*, *Medicago*, *Ricinus*, *Solanum* y *Vigna*.

Gordon propuso, en 1965, una lista con 66 formas especiales de *Fusarium oxysporum*. Desde entonces el número de formas especiales se ha ido incrementando, así Booth en 1971, propone 72 y Armstrong y Armstrong (1981) detallan hasta 77. En muchas de ellas se han encontrado dos o más razas fisiológicas.

El ciclo de vida de *F. oxysporum* incluye un crecimiento saprofítico y un crecimiento parasítico (Fig.1), con distintas fases en cada uno de ellos (Beckman, 1987). La fase parasitaria se inicia con la penetración en los tejidos del hospedador y la entrada a su sistema vascular, aunque muchas cepas de *Fusarium oxysporum* son capaces de penetrar en los tejidos corticales de la raíz, las cepas específicas del hospedador son las únicas capaces de penetrar hasta el tejido vascular y causar marchitez. La penetración tiene lugar principalmente por la zona de elongación de la raíz y puede facilitarse por heridas o ataques de nematodos; desde el punto de penetración el hongo se extiende hacia arriba por los vasos xilemáticos mediante el crecimiento micelial y la formación de microconidias. En estadios posteriores puede extenderse al tejido adyacente causando necrosis que son visibles exteriormente. La patogenesis está relacionada con el bloqueo de los vasos y con la formación de enzimas y toxinas. La fase saprofítica de crecimiento se inicia cuando los tejidos infectados del hospedador empiezan a manifestar síntomas de senescencia y mueren. Los *Fusaria* vasculares, que se ramifican por el tejido vascular invadiendo las células del parenquima cortical, generan una substancial masa productora de clamidosporas. Estas estructuras son las que permiten a las formas patogénicas permanecer en suelos mucho tiempo después de que una cosecha susceptible haya sido eliminada (Burges, 1981). La formación de clamidosporas empieza cuando los niveles de carbohidratos descienden en los tejidos moribundos del hospedador (Hsu y Lockwood, 1973). Conforme los tejidos del hospedador se desintegran, las clamidosporas son liberadas al suelo, individualmente o junto con hifas en los restos vegetales. Clamidosporas pueden persistir de forma inactiva durante varios años gracias a la pared fuertemente engrosada y a las reservas almacenadas y germinar al disponer de nutrientes, por ejemplo en las

proximidad de partes jóvenes de raíces o de desechos orgánicos del suelo, favorece la germinación de nuevas clamidosporas.

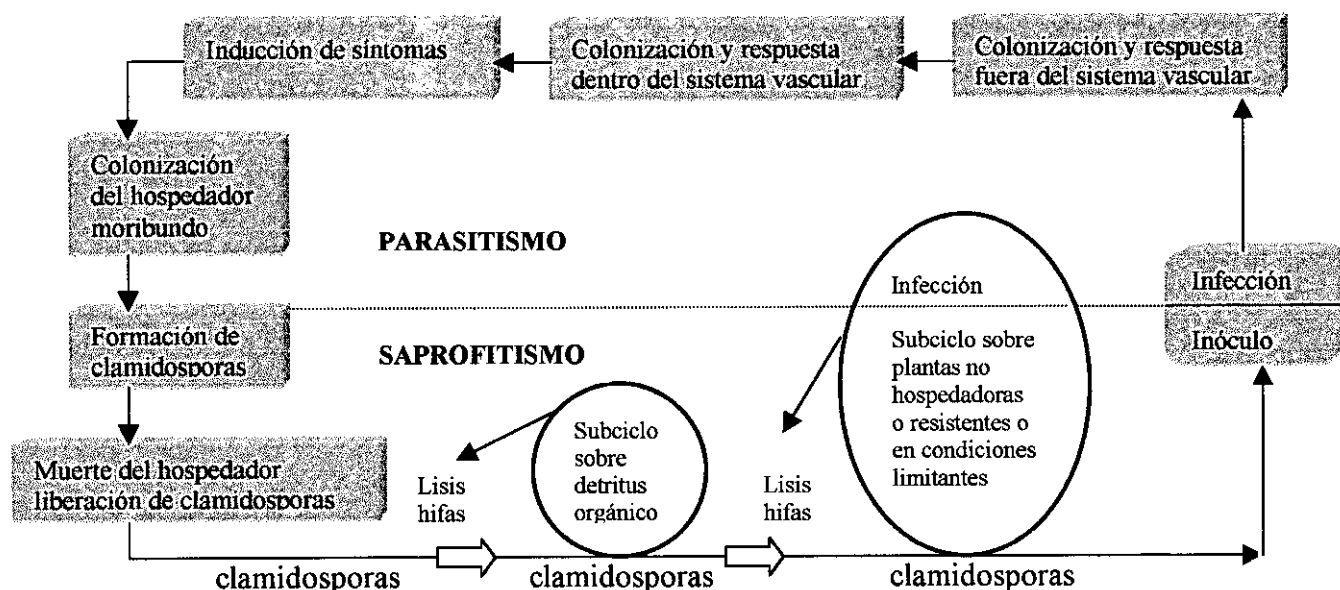


Fig.- 1: Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum*. (Beckmam, 1987).

I.1.1.a - La fusariosis vascular causada por *Fusarium oxysporum*.

Los marchitamientos vasculares producidos por *F. oxysporum* ocurren en muchos cultivos de plantas. Las especies vasculares pueden atacar a sus hospedadores en cualquier momento del ciclo vital de los mismos, antes de la emergencia, en estado de plántula y sobre todo, cuando la planta es adulta.

El ciclo comienza cuando las raíces de plantas susceptibles entran en contacto con las hifas del hongo que se han desarrollado en el suelo. La forma de introducirse es a través de aberturas originadas en las raíces laterales emergentes o por zonas dañadas mecánicamente. Una vez en el interior de las raíces el hongo extiende hacia la región del xilema. Una vez allí el hongo se extiende hacia arriba por los vasos xilemáticos, donde secreta enzimas pécticas. Las células parenquimáticas mueren, produciéndose una coloración marrón en todos los vasos afectados.

Según Tello (tesis doctoral, 1989), los síntomas son los siguientes, se produce un marchitamiento, irreversible, generalizado de toda la planta, que se combina no con el amarilleamiento de las hojas más viejas. En otras ocasiones las hojas amarillean desde la base hasta la yema terminal deteniendo la planta su crecimiento, pero sin llegar a morir.

En el interior de los tallos enfermos se observa un oscurecimiento, que en ocasiones se extiende al parénquima cortical subyacente, y aparece en el exterior de los tallos, como una estría pardo-marrón sobre la que crece el cuerpo fructífero de *F. oxysporum*.



Fig.-2: Marchitamiento vascular producido por *Fusarium oxysporum*. a: planta madura mostrando el típico color amarillento. b: sección longitudinal de un vaso en la que se muestra el oscurecimiento del sistema vascular.

Los síntomas externos van acompañados de un tamponamiento de los elementos traquéales debido por un lado al crecimiento del hongo y por otro al gel que se origina como consecuencia de la mezcla de productos pécticos originados por la actividad enzimática. Se producen, además, toxinas extracelulares que se desplazan hacia las hojas provocando la pérdida de la turgencia. Todos estos efectos combinados son posiblemente los responsables del marchitamiento de los cultivos (Roberts y Boothroyd, 1984).

Muchas de las formas especiales de *F. oxysporum* incluyen parásitos estrictamente vasculares, el más representativo es *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL).

Esta forma especializada, es responsable de la fusariosis vascular del tomate (*Lycopersicon esculentum*). La primera referencia sobre la marchitez de plantas de tomate producida por FOL es de 1895, y su presencia ha sido citada al menos en 32 países, a menudo como responsable de grandes pérdidas económicas. La enfermedad continúa apareciendo como consecuencia del cultivo intensivo de tomate. El uso de variantes resistentes, especialmente la resistencia monogenética, ha sido y continua siendo, hasta ahora, el principal medio de control, pero tiene el problema de la aparición de variedades resistentes, así en aquellas zonas cultivadas durante varios años con variedades que incorporan el gen *I*, dominante para la resistencia a la raza 1 de FOL, ha aparecido una nueva raza del patógeno, la raza 2. Esta raza ha sido también controlada por el descubrimiento y posterior incorporación, de un nuevo gen dominante para la resistencia, el gen *I-2*. En 1981 se identificó una nueva raza en Brasil, la raza 3. También se ha localizado resistencia monogenética para esta raza, pero aún no ha sido incorporada a las variedades comerciales.

Otro método de control de la enfermedad es la aplicación de plaguicidas durante el desarrollo de la planta, pero es caro y no buen resultado. También se están estudiando las posibilidades del control biológico, por ejemplo De Cal *et al.*, 1997 están ensayando la efectividad de *Penicillium oxalicum* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y Alfonso *et al.*, 1992, también han realizado ensayos de control biológico sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* con varias hongos no patógenos

I.1.1.b.- La podredumbre del cuello y la raíz.

El representante típico de esta sintomatología es *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*.

I.1.2.- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*

I.1.2.a.- Distribución.

En otoño de 1985, se detectó en los cultivos de tomate de invernadero de la región de Murcia, una enfermedad no descrita hasta entonces en España, basándose en la

sintomatología y en los tests de patogenicidad se demostró que el agente causal era *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) (Tello y Lacasa 1988)

La micosis producida por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL), según denominación de Jarvis y Shoemaker (1978), ha sido inventariada en diferentes países: Estados Unidos (Leary y Endo, 1971; Sonoda, 1976;); Japón (Yamamoto *et al.* 1974); Canadá (Jarvis y Thorpè, 1976); Israel (Krikun *et al.*, 1982); Francia (Couteaudier, *et al.* 1984) y Grecia (Malathrakis, 1985).

Se tomaron muestras de todos estos lugares y se comprobó que todas ellas producían los mismos síntomas sobre el tomate (Jarvis y Shoemaker, 1978), sin embargo, aunque todas ellas tenían como hospedador específico al género *Lycopersicon*, los síntomas causados eran netamente distintos a los producidos por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Cooper, 1978). También se comprobó que FORL es patógeno en cultivos que son resistentes a las razas 1 y 2 de FOL (Rowe, 1980; Sato y Araki, 1974; Yamamoto *et al.*, 1974).

1.1.2.b.-Sintomatología de la "enfermedad de los invernaderos" causada por FORL.

El hongo entra por los tejidos corticales de la raíz y el hipocótilo, la penetración tiene lugar principalmente por la zona de elongación de la raíz y puede facilitarse por heridas o ataques de nematodos. Por el camino va causando heridas en emergencias secundarias y raíces adventicias (Jarvis y Thropè, 1976).



Fig.-3: Manifestación del parasitismo. Comparese con la planta testigo. (Tello y Lacasa, 1988)

Se produce un marchitamiento irreversible generalizado a toda la planta, que se combina, o no, con amarilleamiento de las hojas más viejas (Fig. 3). En otras ocasiones, las hojas amarillean desde la base a la yema terminal, deteniendo su crecimiento pero sin llegar a morir. La mayor manifestación de síntomas ocurre cuando está próxima la primera cosecha de frutos; sin embargo también se observa en plantas recién transplantadas.

El sistema radicular presenta podredumbres de color marrón chocolate, que en el caso más grave afecta en su totalidad a las raíces principal y secundaria. En ocasiones, aunque en la epidermis de la raíz principal y del cuello no hay manifestación de daños, la médula presenta una podredumbre húmeda de color marrón intenso, que se extiende, no más de 25 centímetros, sobre la zona de transición raíz-cuello, pudiendo el hongo ser aislado a 1 ó 2 centímetros de la "mancha marrón" (Fig. 4).

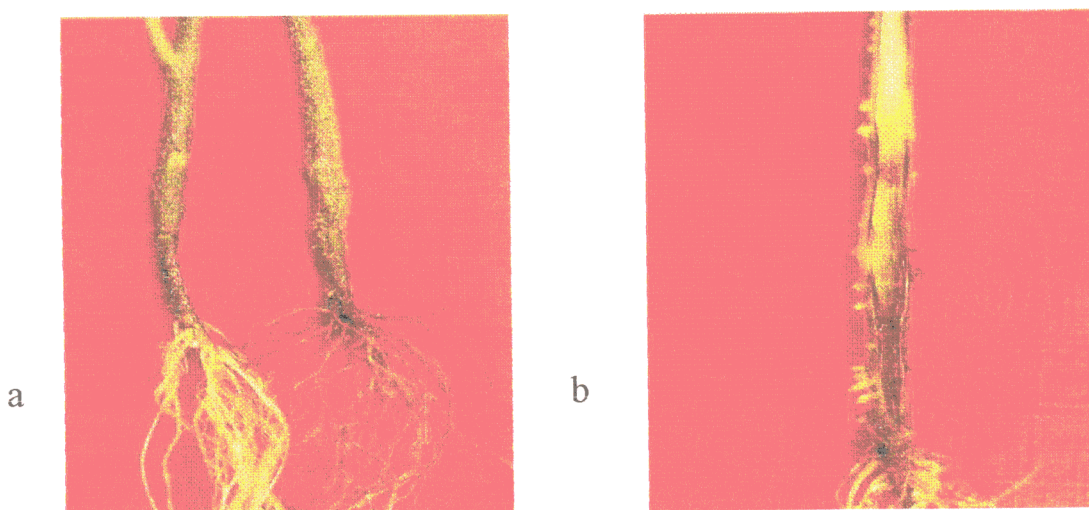


Fig.-4: a: Podredumbre radicular y del cuello producida por FORL (derecha) , compárese con la planta testigo (izquierda). b: podredumbre del cuello y de la raíz principal, necrosis vascular y emisión de raíces adventicias provocadas por FORL (tello y Lacasa, 1988).

El xilema aparece, como una continuación de la podredumbre medular del tallo, con una necrosis marrón, que puede remontarse hasta casi 50 centímetros de altura. En algunas ocasiones, los tallos de las plantas enfermas, están recorridos en su epidermis por una necrosis marrón, lineal, que puede alcanzar casi hasta la copa (Tello y Lacasa, 1988).

No de forma infrecuente, los tallos de las plantas enfermas están recorridos en su epidermis por una necrosis marrón, lineal, que puede alcanzar casi hasta la copa.

El hongo es capaz de infectar a las semillas (Jarvis y Thropè, 1976; Sánchez *et al.*, 1975), pero la planta infectada experimentalmente, normalmente no se marchita hasta que se producen las condiciones adecuadas para el nacimiento del fruto (Sato y Araki, 1974; Sonoda, 1976; Yamamoto *et al.*, 1974).

Estudios ultraestructurales en tomates infectados por este organismo demuestran que la colonización de la raíz es muy agresiva. La epidermis es colonizada entre las 12 y las 24 horas después de la inoculación. En esta primera etapa y un poco más tarde (96 horas) el patógeno habitualmente está limitado al área cortical externa, donde encontramos células fúngicas tanto intra como intercelularmente. El engrosamiento de las paredes y la formación de papilas son los principales síntomas que se manifiestan en las células corticales, pero están totalmente ausentes en la endodermis y en el sistema vascular.

Entre las 96 y las 120 horas las hifas se hacen visibles en la endodermis y 24 horas más tarde la estela vascular es colonizada, en este último paso las células parenquimatosas reaccionan como las células corticales y la invasión de los vasos se produce directamente a través de la lámina media y de las puntuaciones de las membranas.

En el área cortical el citoplasma y las paredes se muestran totalmente desintegrados cuando la raíz completa está colonizada; alrededor de las 144 horas después de la inoculación.

Las células de la endodermis a veces están colapsadas y presentan signos de incipiente degradación que se hace más pronunciada cuando el patógeno llega al sistema vascular. Al mismo tiempo se observan los síntomas de clorosis y la incipiente flacidez de las hojas.

La extensiva desintegración de la pared celular observada en estudios ultraestructurales (Rowe, 1980; Charest *et al.*, 1984) indican que este hongo produce

alteraciones vinculadas a la pared similares a las producidas por otros patógenos vasculares como *Fusarium oxysporum* y *Verticillium*.

La podredumbre del cuello y de la raíz es el síntoma dominante, en esta patología, pero también el marchitamiento puede observarse en plantas cuando está próxima la cosecha de frutos (Jarvis y Shoemaker, 1978; Rowe, 1980).

Charest *et al.*, (1984) describen que la clorosis y la flacidez de las hojas se observan incluso cuando los primeros vasos acaban de ser colonizados, indicando que la necrosis del tejido perivascular, incluyendo el cortex y el floema primario, puede en sí misma contribuir a los síntomas del marchitamiento. Es posible, a pesar de la gravedad que la planta pueda recuperarse parcialmente, incrementando las raíces secundarias.

I.1.2.c.- Especificidad parasitaria.

Aparte de parasitar al tomate (*Lycopersicon esculentum*), FORL afecta al pimiento (*Capsicum frutescens*) (Yamamoto *et al.*, 1974; Rowe, 1980) y a la berenjena (*Solanum melongena*) (Rowe, 1980), También se ha descrito que muchas leguminosas pueden ser susceptibles (Jones *et al.*, 1991).

I.2.- LA PARED CELULAR.

La pared es responsable de varias funciones, proporciona resistencia mecánica, mantiene la forma de las células, controlando la expansión celular, sirve para regular el transporte intercelular, mantener las fuentes de reserva y proteger contra otros organismos; al mismo tiempo está involucrada en las interacciones entre las plantas y sus patógenos (Albersheim, 1976; Brett y Waldron, 1990).

La pared celular rica en polisacáridos es la primera línea de defensa de la planta contra un patógeno. La pared celular es, por un lado, un soporte inerte que actúa como barrera, pero por otro lado es dinámica y metabólicamente activa (Robinson, 1991). La mayoría de los hongos que pretenden colonizar una planta necesitan romper esta barrera para poder acceder a los tejidos y al mismo tiempo la degradación de la pared proporciona

los nutrientes que necesita el hongo para poder crecer y completar su proceso de invasión. Se acepta, de manera mayoritaria, que el arsenal enzimático del hongo contribuye, junto con las fuerzas mecánicas (Howard *et al.*, 1991) a la degradación de ambas, cutícula y pared.

Según varios autores (Bowles, 1990; Esquerré-Tugayé *et al.*, 1979; Vance *et al.*, 1980), la pared es capaz de formar recubrimientos de proteínas y lignina como respuesta frente a la invasión de un hongo patógeno. Esto viene a confirmar que la pared no es una estructura estática e inerte, sino que es en realidad, una extensión virtual del citoplasma con el que mantiene una continuidad molecular (Roberts, 1990).

I.2.1.- **Pared celular primaria.**

Las paredes celulares primarias son las paredes de las células en crecimiento. Los polisacáridos constituyen aproximadamente un 90% de la estructura de estas paredes. Durante el crecimiento, los enlaces entre polisacáridos se rompen, la pared se expande y las moléculas nuevas se insertan entre las ya existentes.

La pared celular primaria de las plantas está compuesta por una matriz de polisacáridos y proteínas estructurales, constituyendo un sistema bifásico (McNeil, *et al.*, 1984). Todo esto se coloca alrededor de la célula en diferentes estratos y hace que la pared sea química y físicamente robusta y estable (Carpita y Gibeaut, 1993).

Existen dos tipos de pared celular primaria en plantas: el tipo I, presente en todas las dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas y el tipo II presente en especies de la familia *Poaceae* y en otras monocotiledóneas próximas. (Carpita y Gibeaut, 1993). Nos vamos a centrar en la pared celular tipo I por ser el tipo de pared de las plantas de tomate.

I.2.2.- **Pared celular tipo I.**

La pared celular primaria tipo I (Fig. 5) comprende tres dominios estructuralmente independientes, pero que interaccionan entre sí. El primer dominio es el almacén principal de celulosa y xiloglucano (sobre el 50 % de la masa total de la pared), este dominio está

embebido en un segundo dominio que es la matriz de polisacáridos pécticos (sobre el 30 % de la masa total de la pared). El tercer dominio independiente lo constituyen las proteínas estructurales, que normalmente son las extensinas o glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs).

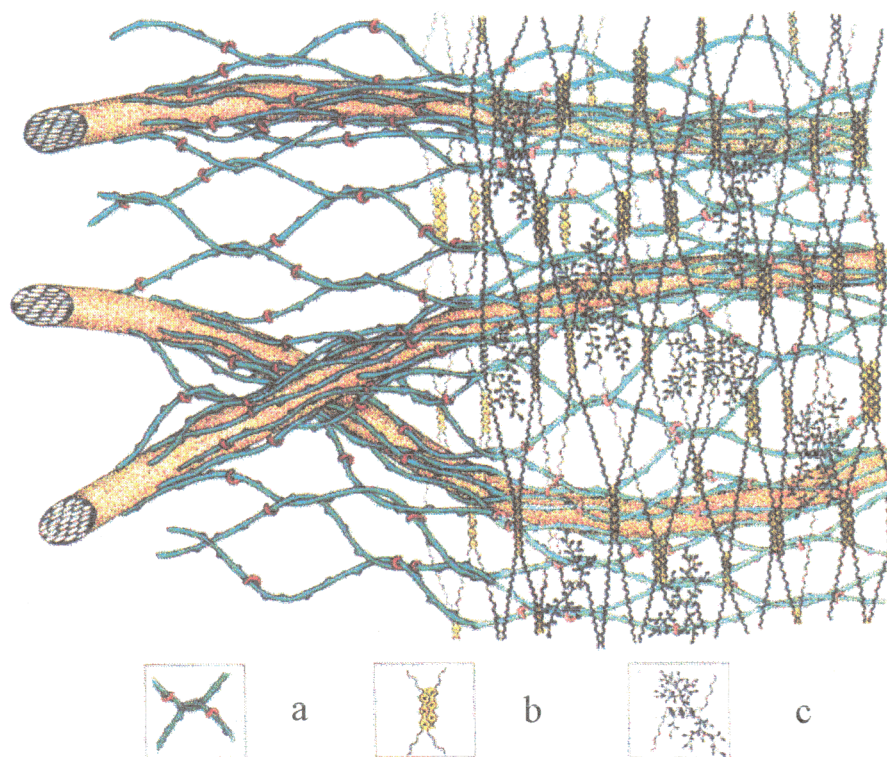


Fig-5: Composición de la pared primaria tipo I. Las fibras de celulosa están entrelazadas con los xiloglucanos (a) y todo este armazón se encuentra embebido en la matriz péctica de ácido poligalacturónico (b) y ramnogalacturonano con pequeños grupos poliméricos de arabinano, galactano y arabinogalactano (c). (Carpita y Gibcaut, 1993).

La capa de celulosa está formada por una red de microfibrillas de celulosa. Las microfibrillas se componen de algunas docenas de cadenas lineales de β -1,4 glucano que se condensan para formar largos cristales que tienen un ancho aproximado de 5-15 nm (McCann *et al.*, 1990). La estabilización de las moléculas dentro de las microfibrillas se logra mediante puentes de hidrógeno entre residuos de glucosa adyacentes y entre cadenas adyacentes. El espacio que queda entre las microfibrillas es de unos 20-40 nm y queda ocupado por el resto de componentes de la pared, que conectan las fibras entre sí (Carpita *et al.*, 1993).

En este tipo de pared celular, el principal polisacárido entrelazante es el xiloglucano, otros tipos de polisacáridos no celulósicos se encuentran en mucho menor proporción (Bacic *et al.*, 1988; Darvill *et al.*, 1980). Los xiloglucanos son cadenas lineales de β -1,4 glucanos, pero al contrario que la celulosa estos poseen numerosos residuos xilulolíticos unidos en posición O-6 a las unidades de glucosa de la cadena, siguiendo un patrón regular. Unidades adicionales de galactosa o arabinosa, se pueden unir en posición O-2 a algunas unidades de xilosil (Bacic *et al.*, 1988). Hay, también, posibles uniones de fucosa en posición O-2 a los restos de galactosil, lo que conllevaría la formación de cadenas alternas de trisacáridos (Hisamatsu *et al.* 1991). En los primeros modelos de pared primaria de dicotiledóneas se consideraba que los xiloglucanos presentaban una configuración lineal, estableciendo puentes de hidrógeno con los glucanos de las microfibrillas de celulosa (Albersheim, 1976; McNeil *et al.*, 1984). Actualmente se admite una configuración regularmente ondulada en los xiloglucanos y una doble posición en la pared, la tradicional que defendía que el xiloglucano está fuertemente unido a los glucanos expuestos de las microfibrillas de celulosa y la moderna que sostiene que los xiloglucanos se extienden entre dos microfibrillas y se enlazan con otros xiloglucanos, lo que está más en concordancia con la presencia de cantidades iguales de celulosa y xiloglucano en este tipo de paredes (Carpita *et al.*, 1993).

Este armazón principal constituido por celulosa y xiloglucano está entrelazado con los polisacáridos pécticos o pectinas de la pared. Las sustancias pécticas son polisacáridos ácidos de alto peso molecular que están ampliamente extendidas en el reino vegetal. Son el componente principal de la lámina media (Darvill *et al.*, 1980) donde juegan un papel importante al ser el único polisacárido responsable de la cohesión celular. Los polímeros pécticos, que constituyen la pared, tienen varias funciones: son agente cementante y lubricante, determinan la porosidad de la pared, proporcionan superficies cargadas que modulan el pH y el balance de iones (McNeil, *et al.*, 1984). Las conexiones entre la pared y la membrana plasmática mantienen la presión osmótica (Zhu *et al.*, 1993). La pared también sirve como señal para el desarrollo de respuestas frente a patógenos o simbiontes, por ejemplo el ataque de insectos provoca la producción de unas señales en de la pared celular que inducen la

síntesis de moléculas de defensa en la planta (Ryan, 1990) y cuando se produce una invasión de hongos o bacterias patógenas la pared responde mediante acumulos de proteínas o lignina (Bowles, 1990; Carpita y Gibeaut, 1993).

En el pasado se han utilizado un gran número de términos confusos para las sustancias pécticas. En 1944 el Comité para la Revisión de la Nomenclatura de las sustancias pécticas aceptó las siguientes definiciones (Sakai *et al.*, 1993):

- **SUSTANCIAS PÉCTICAS:** Son un grupo de complejos coloidales derivados de carbohidratos que están presentes en las plantas y que contienen una gran cantidad de ácido galacturónico. Los grupos carboxilo del galacturónico pueden estar parcialmente esterificados con grupos metilo y parcial o completamente neutralizados por una o más bases.
- **ÁCIDO PÉCTICO:** Sustancia péctica compuesta por ácido poligalacturónico y esencialmente libre de grupos metiléster. Los pectatos son las sales de los ácidos pécticos.
- **PECTINA:** ácido poligalacturónico esterificado con una cantidad considerable de grupos metiléster. Los pectinatos son las sales de la pectina.
- **PROTOPECTINA:** Pectina insoluble en agua fijada a los tejidos de las plantas.

En cuanto a sus propiedades generales, la pectina es un heteropolisacárido con galacturónico y metanol como principales componentes, y con algunos azúcares neutros unidos. Las cadenas de pectina están formadas por alrededor de 200 unidades de ácido galacturónico unidas por enlace enlaces α -1,4 (Fig. 6). Algunas pectinas como las del tabaco, lino y remolacha contienen además restos de ácido acético. Los grupos carboxilo de la pectina están parcialmente esterificados con metanol y algunos grupos hidroxilo están, a veces, parcialmente acetilados. El grado de esterificación depende del tipo de pectina, así por ejemplo la pectina de manzana tiene un grado de esterificación de alrededor de un 70%, mientras que la de patata tiene un 31 %. En el caso de la acetilación ocurre exactamente igual, siendo la pectina de manzana una de las menos acetiladas (Voragen *et al.*, 1986). Algunas pectinas contienen otros azúcares que se

unen a lo largo de la cadena de poligalacturónico, como por ejemplo, galactosa, arabinosa o ramnosa (Sakai *et al.*, 1993).

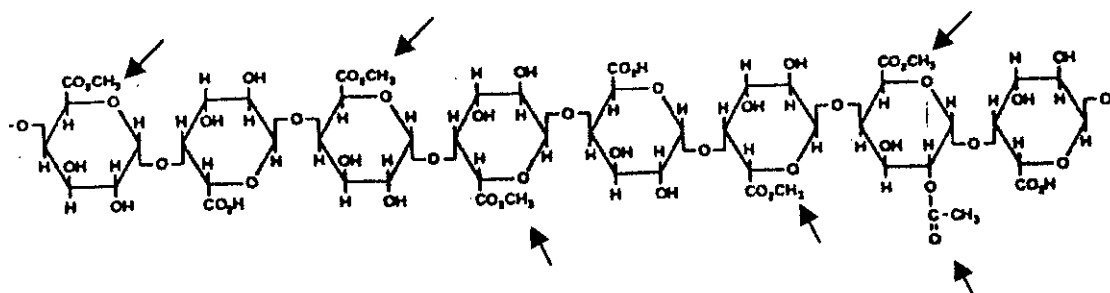


Fig.- 6: Estructura parcial de una molécula de pectina (Pippen, *et al.*, 1950). Los residuos metilo están señalados en rojo y los acetilo en azul.

El esqueleto principal, formado por ácido poligalacturónico, está periódicamente interrumpido por la inserción de residuos de α -ramnopiranososa. Este heteropolímero, en forma de barra retorcida, está constituido por cadenas de α -1,4 galacturonosil entremezclados con residuos de α -1,2 ramnosil (Lau *et al.*, 1985). Existen además cadenas laterales con residuos de otros azúcares neutros como L-arabinosil o D-galactosil (que son los más frecuentes) o D- Xilosil y L-fucosil (que son menos frecuentes), unidos al carbono 3 ó 4 de la ramnosa (Aspinall, 1981; Barrett y Northcote, 1965). Todo esto hace que el esqueleto principal, liso, aparezca a veces formando regiones altamente ramificadas que se conocen como regiones “peludas”.

Una de las propiedades características de las regiones lisas que tienen menos de un 50% de esterificación es que suelen formar geles mediante la unión de moléculas de calcio (Rees, 1977). Además de formar complejos con moléculas de calcio, las pectinas pueden unirse a otros iones metálicos como zinc, cobre, o hierro. A través del calcio se unen dos cadenas antiparalelas de poligalacturónico (Jarvis, 1984; Powell *et al.*, 1982), siendo necesarios solamente unos pocos residuos de calcio sin esterificar para formar estas estructuras altamente estable conocidas como “caja de huevos” (Fig.7). Aparte del grado de esterificación, pH, y concentración de azúcar o ácido, la longitud de la cadena, el grado de polimerización, la temperatura y la presencia de otros iones juegan un papel importantísimo en la formación de los geles.

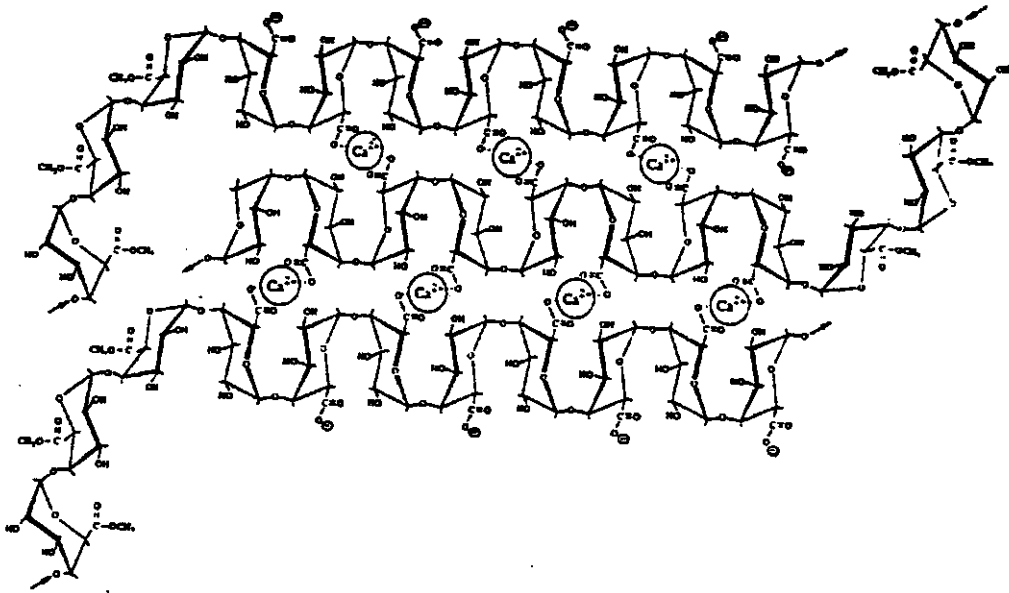


Fig-7: Estructura en forma de “caja de huevos”: tres cadenas antiparalelas de poligalacturónico enlazadas con calcio por las regiones no esterificadas. Las zonas esterificadas impiden la unión del calcio. (Carpita y Gibeaut, 1993).

El tercer dominio independiente de la pared celular primaria son las proteínas estructurales. Como hemos dicho las principales y mejor estudiadas de todas las proteínas de la pared son las extensinas o glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), la función principal de estas proteínas es la de mantener o bloquear la configuración de la pared una vez que se ha producido la elongación de la misma (Lamport, 1986), la extensina prepara a la célula para que pare su crecimiento, un aumento en la cantidad de extensina de la pared va ligado al cese del crecimiento. Las unidades de extensina pueden unirse covalentemente entre sí, constituyendo una entidad independiente de las otras dos entidades representadas en la pared (celulosa con xiloglucanos y pectinas). Otras proteínas, que pueden ser necesarias para bloquear el crecimiento de la pared, junto a las extensinas son las proteínas ricas en prolina (PRPs) (Chen y Varner, 1985; Hong *et al.*, 1987) estas proteínas se expresarían en más cantidad.

Otro grupo de proteínas de la pared que parecen tener una función importante son las proteínas ricas en glicina o GRP, estas proteínas parecen tener una configuración de β -hélice, pero con su dominio C-terminal extendido hacia la membrana plasmática. Estas proteínas son muy importantes en la interfase entre la membrana y la pared y la

colección de aminoácidos aromáticos que poseen en la cara que da a la pared podrían servir como sitios de iniciación para la lignificación (Condit y Meagher, 1986).

Por la invasión de patógenos se sintetizan unos elicitores que provocan un aumento en la síntesis de extensina y el daño mecánico lleva a un aumento de las proteínas ricas en prolina y de las proteínas estructurales ricas en glicina (GRPs). Estos hechos han llevado a pensar que las proteínas estructurales de la pared ejercen una función de defensa frente a patógenos potenciales (Tierney *et al.*, 1988).

Además de estas proteínas se han detectado numerosas enzimas asociadas a la pared celular. Todas ellas están perfectamente adaptadas a las duras condiciones existentes en la pared, es decir, tienen por ejemplo pHs óptimos entre 4 y 6. Prácticamente todas son hidrolasas u oxidorreductasas. El grado de asociación de las enzimas a la pared celular puede ser muy diferente según el tipo de enzima: pueden ser solubles en el apoplasto, o unidas covalente o iónicamente a la pared.

1.3 ENZIMAS DEGRADADORAS DE LA PARED CELULAR

Como ya hemos comentado en el apartado anterior, la primera línea de defensa de las plantas frente a hongos fitopatógenos es su pared celular. La mayoría de los hongos producen polisacaridasas que pueden alterar o degradar los distintos polisacáridos presentes en la pared celular de plantas superiores (Bateman, 1976; Knogge, 1996). La mayoría de los autores aceptan que el arsenal enzimático del hongo contribuye junto con las fuerzas mecánicas a la degradación de la cutícula y la pared (Howard *et al.*, 1991).

Numerosos autores (Bateman y Basham, 1976; Collmer y Keen, 1986; Cooper, 1987; Hahn *et al.*, 1989) han descrito las evidencias bioquímicas que existen para demostrar la relación entre las enzimas que degradan la pared celular (CWDE) y el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Así podemos observar como los fragmentos pécticos, que se liberan por la acción de las enzimas pécticas, pueden formar geles que taponan los vasos xilemáticos, provocando estrés hídrico, que es un síntoma típico producido por los hongos que atacan al sistema vascular. Otros síntomas, que pueden originarse indirectamente debido a la degradación de las paredes celulares, son la abscisión

y la epinastia, provocadas por el aumento de etileno y las clorosis, provocadas por la generación de peróxido de hidrógeno, ambos (etileno y peróxido de hidrógeno) debidos a la acción de la glucosa oxidasa (Cooper, 1984).

La degradación enzimática de la pared por parte del patógeno, no solo es importante para la penetración, sino que permite al hongo la obtención de nutrientes (Cooper, 1983). Las enzimas con actividad “endo”, es decir las que rompen al azar por el interior de las cadenas de polisacáridos, son capaces de producir maceración en los tejidos, mientras que las que tienen actividad “exo”, es decir rompen las cadenas por el extremo, comenzando por el extremo no reductor de la cadena de polisacárido, proporcionan nutrientes al patógeno a partir de las sustancias pécticas de la pared del hospedador (Bateman, 1966; Bateman y Bashman, 1976).

Es totalmente cierto que la nutrición del microorganismo invasor es la base fundamental de la patogénesis y que la entrada del microorganismo es el prerequisite esencial de la invasión, pero las enzimas degradadoras de la pared son señales que disparan otros muchos procesos fisiológicos, incluyendo las respuestas de defensa de la planta, la activación de muchas hormonas, y el control del crecimiento y desarrollo (Walton, 1994).

La interacción entre una planta y un hongo, no siempre lleva consigo la invasión de los tejidos de la planta y el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Las plantas, de hecho, son resistentes a la mayoría de los hongos fitopatógenos y el desarrollo del hongo normalmente se frena poco tiempo después de la penetración. Los hongos que han adquirido la capacidad de invadir tejidos de una planta en particular (su hospedador) y/o neutralizar los mecanismos de resistencia han establecido la llamada “compatibilidad básica”. En las interacciones incompatibles, el bloqueo del desarrollo del hongo está normalmente causado por los mecanismos de defensa activa de la planta. El desencadenamiento de estos sucesos está precedido por el reconocimiento del microorganismo por la planta. Las moléculas fúngicas implicadas en el reconocimiento hospedador-patógeno, así como las enzimas que degradan la pared celular, juegan un papel muy importante en el proceso de reconocimiento y en la inducción de los mecanismos de defensa.

1.3.1.- Tipos de enzimas pécticas.

La gran cantidad de enzimas capaces de degradar la pared celular, refleja la inmensa complejidad de las estructuras polisacarídicas de la pared. La mayoría de los hongos producen un gran arsenal de enzimas capaz de despolimerizar estos polisacáridos. Estas enzimas suelen ser glicoproteínas, inducibles cuando el hongo crece sobre paredes celulares (De Lorenzo *et al.*, 1996).

| ENZIMA | REFERENCIA (sólo se da una por cada enzima) |
|---|---|
| Enzimas pécticas | |
| Hidrolasas | |
| Endopoligalacturonasas | Stratilova <i>et al.</i> , 1993. |
| Exopoligalacturonasas | Valsangiacomo y Gessler, 1992. |
| Ramnogalacturonasas | Schols <i>et al.</i> , 1990. |
| Liasas | |
| Endopectatoliasas | Robertsen, 1989. |
| Exopectatoliasas | Linhardt <i>et al.</i> , 1986. |
| Endopectinliasas | Linhardt <i>et al.</i> , 1986 |
| Exopectinliasas | Linhardt <i>et al.</i> , 1986 |
| Esterasas | |
| Pectinmetilesterasas | Schejter y Marcus, 1988 |
| Ramnogalacturonano acetilesterasa | Searle Van Leeuwen, <i>et al.</i> , 1992. |
| Celulasas | |
| Endo- β -1,4-glucanasa (carboximetilcelulasa) | Vincken <i>et al.</i> , 1994. |
| Exo- β -1,4-glucanasa | Collings <i>et al.</i> , 1988. |
| Endo- β -1,4-glucanoclobiohidrolasa | Blanchette <i>et al.</i> , 1989. |
| β -glucosidasa | Collings <i>et al.</i> , 1988. |
| Enzimas despolimerizantes de la matriz neutra de polisacáridos | |
| Endo- α -1,5-arabinasa | Flippin <i>et al.</i> , 1993. |
| α -L-arabinofuranosidasa | Cooper 1987. |
| Endo- β -1,4-xilanasa | Apel <i>et al.</i> , 1993. |
| β -xilosidasa | Tan <i>et al.</i> , 1987. |
| Endo- β -1,4-glucanasa | Gilkes <i>et al.</i> , 1991. |
| Exo- β -1,4-glucanasa | Collings <i>et al.</i> , 1988. |
| Exo- β -1,3-glucanasa (laminarinasa) | Stahmann <i>et al.</i> , 1993. |
| Exo- β -1,3 1,6-glucanasa (cinereanasa) | Stahmann <i>et al.</i> , 1993. |
| Endo- β -1,6-glucanasa | Rapp, 1989. |
| β -1,4-galactanasa | Urbanek y Zalewska-Sobczak, 1986. |
| α -galactosidasa | Cooper, 1984. |

Tabla-1: Tipo de enzimas que degradan la pared celular producidas por hongos (De Lorenzo *et al.*, 1996).

Hasta el momento se han identificado varias enzimas que degradan la pared celular (Tabla-1). El proceso de identificación de nuevas enzimas, está restringido al avance en el

conocimiento de la estructura de la pared. Las CWDE que rompen enlaces poco comunes en la pared, sólo pueden ser estudiadas si sus sustratos (normalmente polímeros raros o complejos) se purifican en cantidad suficiente y se caracterizan. Si además tenemos en cuenta, que la mayoría de estas enzimas se inducen por sustrato, y están sujetas a represión catabólica, su estudio se limita si las condiciones de cultivo tanto *in vivo* como *in vitro* no son óptimas (De Lorenzo *et al.*, 1996).

I.3.1.c. Enzimas pécticas.

Si tenemos en cuenta que la pectina es el componente mayoritario dentro de la pared de dicotiledóneas, las enzimas capaces de degradar la pectina, Conocidas normalmente como “enzimas pécticas”, son las más estudiadas de todas las CWDE. Sin embargo su papel en la invasión y en la patogénesis no está bien definido.

Cuando un hongo crece sobre paredes celulares, las enzimas pécticas son, invariablemente, las primeras que se secretan (Jones *et al.*, 1972; Mankarios y Friend, 1980). La acción de las enzimas parece ser un prerequisite para la posterior actuación de otras CWDE (Karr y Albersheim, 1970), esta actuación secuencial de las distintas CWDE se explica por la mejor accesibilidad de los polímeros pécticos (Mankarios y Friend, 1980; Collmer y Keen, 1986) y solamente cuando la fracción péctica se degrada, el resto de los componentes, que hasta entonces estaban embebidos en ella, quedan disponibles para su degradación.

Las enzimas pécticas, en general, presentan multitud de isoformas (Cervone, *et al.*, 1986b), característica que puede tener un significado fisiológico, permitiéndole al hongo la invasión aunque las condiciones del hospedador varíen y le protegiéndole frente a posibles pérdidas de patogeneicidad. Las isoformas varían en su estabilidad, su pH óptimo, su actividad específica, tipos de oligosacáridos que liberan y varia tanto la proporción de enzimas, como las que se producen segun crece el hongo en una u otra fuente de carbono.

La actividad de las enzimas pécticas y en general de las CWDE puede estar relacionada con la estrategia de la invasión, así grandes cantidades de enzimas están

asociadas a una rápida destrucción del tejido. Sin embargo los hongos biotróficos o simbióticos producen pocas enzimas, muy bien reguladas (Cervone, 1988).

Básicamente hay dos tipos de enzimas pécticas: ~~pectinesterasas~~ que eliminan los residuos metilo de la pectina, o los residuos acetilo de las regiones altamente ramificadas de la pectina y ~~enzimas depolimerizantes~~, que pueden ser hidrolasas o transeliminadas. Estas últimas enzimas se pueden clasificar atendiendo a tres criterios diferentes: sustrato que prefieren (pectina, poligalacturónico u oligogalacturónidos), modo de ruptura (transeliminación o hidrólisis) o por donde rompen (al azar o por el extremo de la cadena).

Tradicionalmente bajo la denominación de enzimas pecticas se aludía a las enzimas capaces de degradar las regiones lisas de la pectina. Con el descubrimiento de la existencia de regiones altamente ramificadas se han empezado a purificar y caracterizar otras enzimas, lo que se conoce como ~~nuevas enzimas pécticas~~, que son las que degradan las zonas ramificadas de la pectina. Entre ellas podemos encontrar **esterasas**, como por ejemplo la ramnogalacturonano acetil esterasa que desacetila estos residuos y permite la actuación del resto de las enzimas. Podemos encontrar también **hidrolasas**, como la ramnogalacturonasa A, que hidroliza los enlaces que unen la ramnosa con el galacturónico y **liasas** como la Ramnogalacturonasa B, que rompe estos mismos enlaces mediante β -eliminación.

Dentro de las ~~enzimas que degradan las regiones lisas~~ están: Las pectinmetilesterasas, las liasas (pectin y pectato liasas) y las hidrolasas (poligalacturonasas y polimetilgalacturonasas).

Las **pectinmetilesterasas** (pectin metilhidrolasas, EC 3.1.1.11) catalizan la desesterificación del grupo metilo de la pectina formando ácido péctico (poligalacturónico). Las producen tanto bacterias como hongos o plantas superiores. Algunas de ellas son altamente específicas y atacan sólo por el extremo no reductor de la cadena o sólo por el reductor (Miller y Macmillan, 1971). En algunos casos iones como el calcio o el sodio estimulan a las pectinesterasas (PE), esta inducción se produce porque estos iones se unen al ácido poligalacturónico (producto final de estas enzimas)

evitando así la represión por producto final. Son enzimas normalmente inducibles por sustrato y reprimibles por glucosa (Maldonado *et al.*, 1989).

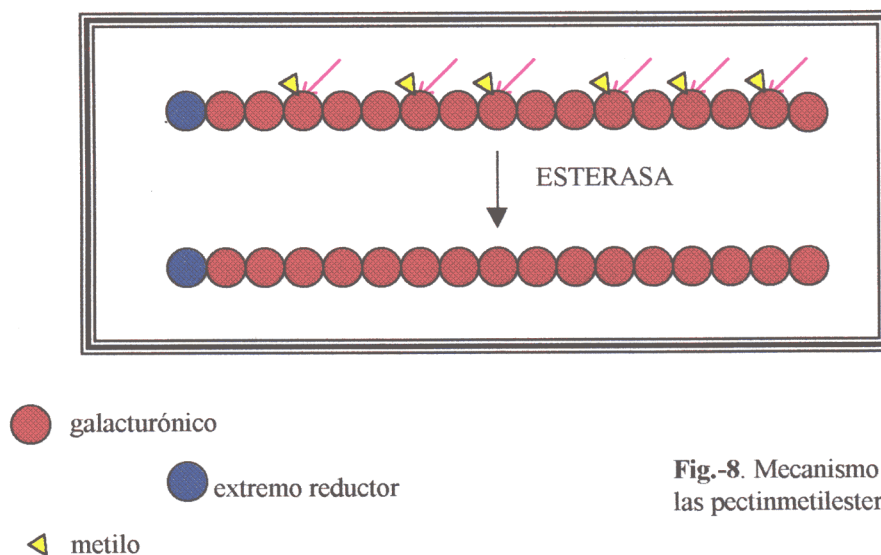
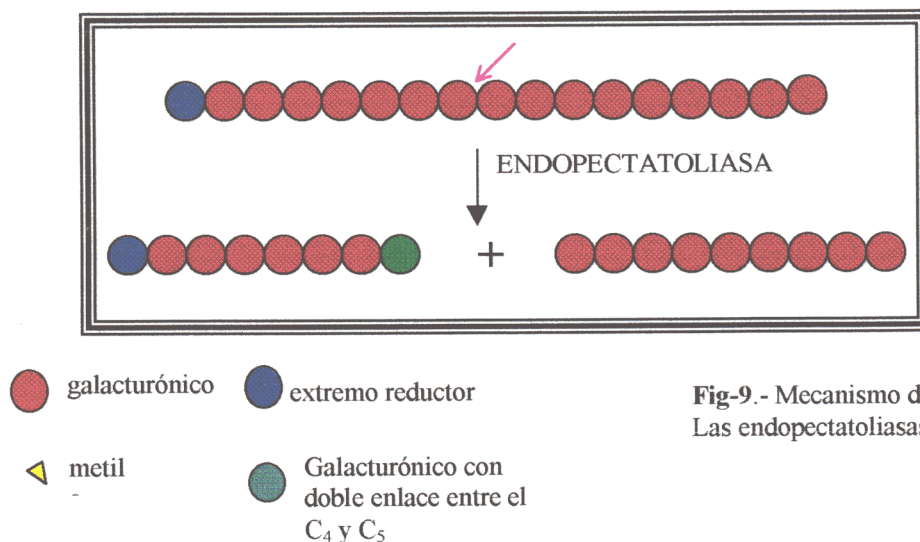


Fig.-8. Mecanismo de acción de las pectinmetilesterasas

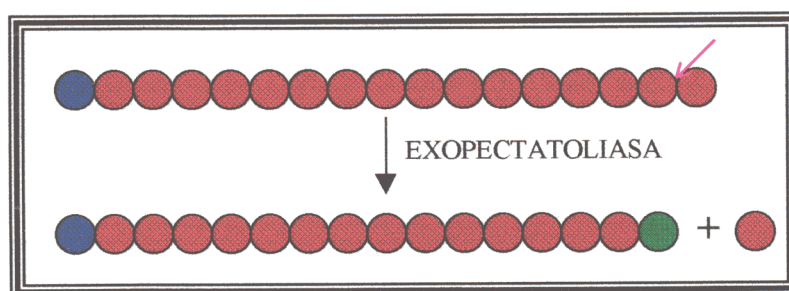
Las **liasas o transeliminadas** llevan a cabo una ruptura transeliminativa (no hidrolítica) del enlace α -1, 4 glicosídico de pectatos y pectinatos que se caracteriza por degradación transeliminativa del polímero de pectina. Las liasas rompen el enlace glicosídico del carbono 4 y simultáneamente eliminan el hidrógeno del carbono 5, formándose así un doble enlace entre el C₄ y C₅ del extremo no reductor del ácido galacturónico formado (Ayers *et al.*, 1966). En muchos aspectos (inducción, represión catabólica...) las liasas se parecen mucho a las hidrolasas (Hubbard, *et al.*, 1978; Kurowski y Dunleavy, 1976).

Según las preferencias de sustrato y el lugar por el que rompen las liasas se pueden clasificar en 4 tipos diferentes:

1.- Endopectatoliasas (EC 4.2.2.2): son aquellas que catalizan la ruptura transeliminativa al azar del enlace α -1, 4 glicosídico del ácido péctico. Su pH óptimo es de 8.0-10.0, son activadas por Ca²⁺ (Lyon *et al.*, 1986) y otros cationes divalentes como Mg²⁺, Co²⁺ y Sr²⁺, todo esto nos sugiere que un par de cadenas de ácido poligalacturónico, unidas por puentes salinos, sea su verdadero sustrato. El principal producto final de estas enzimas es el ácido digalacturónico insaturado (Moran *et al.*, 1968a). La actividad de esta enzima, como ocurre con todas las endo decrece cuando la cadena de sustrato se acorta.



2.- Exopectatoliasas (EC 4.2.2.9): catalizan la ruptura transeeliminativa del enlace α -1, 4 glicosídico del ácido péctico comenzando por el extremo no reductor de la cadena. El sustrato más pequeño que son capaces de degradar es el trímero. Su pH óptimo es igual al de las endo y también se activan por cationes divalentes (Sakai et al., 1996).



3.- Endopectinliasas (EC 4.2.2.10): catalizan la ruptura transeeliminativa al azar del enlace α -1, 4 glicosídico de la molécula de pectina. Estas enzimas se han encontrado en algunos hongos y raramente en bacterias (Sakai *et al.*, 1993). Su actuación provoca un descenso muy rápido de la viscosidad del sustrato. Su pH óptimo va de 5 a 9 y el calcio parece no estimular su actividad (Sakai *et al.*, 1993). Prefieren pectinas altamente esterificadas y nunca atacan al poligalacturónico.

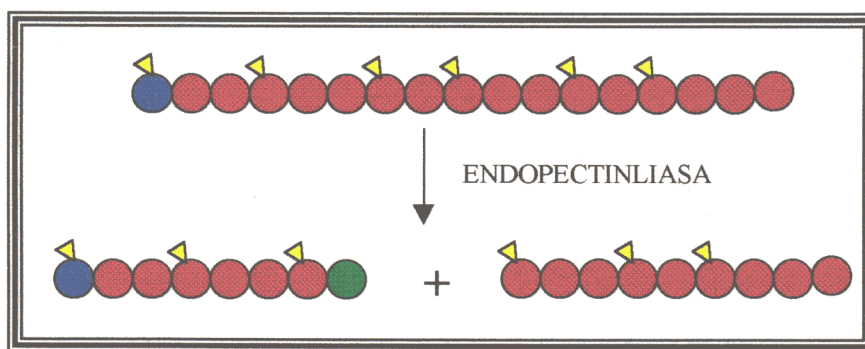


Fig.-11- Mecanismo de acción de las endopectinliasas

4.- Exopectinliasas catalizan la ruptura transeliminativa del enlace α -1, 4 glicosídico de la pectina comenzando por el extremo no reductor de la cadena. Su existencia no ha sido probada.

El último tipo de enzimas que nos falta por describir son las **hidrolasas** que son las que catalizan la ruptura hidrolítica del enlace α -1,4-glicosídico de la pectina o el ácido poligalacturónico. Como ocurre en el caso de las liasas, vamos a distinguir entre polimetilgalacturonasas, si la enzima prefiere como sustrato la pectina, y poligalacturonasas, si la enzima prefiere actuar sobre poligalacturónico.

1.- Polimetilgalacturonasas: Catalizarían la ruptura hidrolítica del enlace α -1,4-glicosídico de la pectina, prefiriendo siempre pectinas altamente esterificadas. Esta ruptura podrá ser al azar por el interior de la cadena, en el caso de las endopectinmetilgalacturonasas, o secuencial, comenzando por el extremo no reductor de la cadena en el caso de las exopectinmetilgalacturonasas. Aunque son numerosos los artículos en los que aparecen estas enzimas su existencia es bastante cuestionable, ya que se piensa que preparaciones de poligalacturonasas, mezcladas con esterases pueden ser confundidas con polimetilgalacturonasas (Sakai *et al.*, 1996).. Además si el residuo no está totalmente esterificado, las poligalacturonasas o las pectato liasas podrían ser capaces de romper el enlace glicosídico.

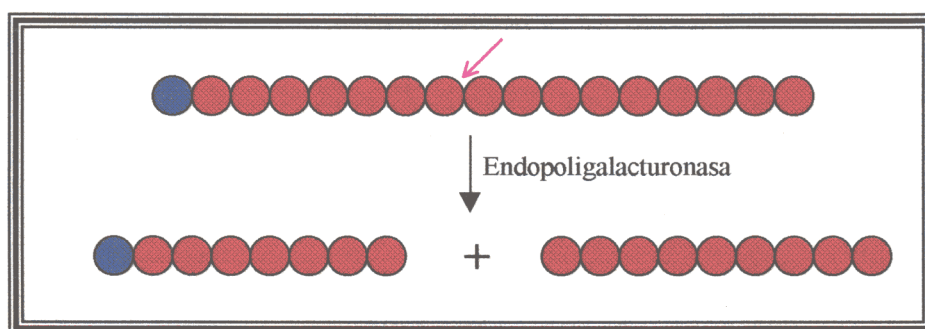
2.- Poligalacturonasas: Catalizan la ruptura hidrolítica del enlace α -1,4-glicosídico del ácido poligalacturónico.

En general, mediante la acción de las poligalacturonasas el ácido péctico o poligalacturónico se degrada a ácido mono, di y trigalacturónico. Estos productos finales se pueden generar por un mecanismo de ataque múltiple a una cadena, con lo que los productos finales se detectan rápidamente, o mediante un mecanismo de ataque a varias cadenas a la vez, si el mecanismo elegido es este último, los productos finales de la hidrólisis se detectarían sólo tras largos periodos de actuación de la enzima. (Fogarty y Kelly, 1983). Hay dos métodos fundamentales de medir la actividad poligalacturonasa. El primer grupo de ensayos se basa en la determinación de grupos reductores liberados como consecuencia de la hidrólisis del sustrato (Somogyi, 1952; Nelson, 1944). El segundo grupo de ensayos está basado en la reducción de la viscosidad del sustrato (Cappellini, 1966; Bateman, 1972). Este último método tiene el problema de su difícil estandarización ya que la viscosidad de la pectina puede variar simplemente al variar el pH, la temperatura, el tampón, la fuerza iónica, o incluso dependiendo del tipo de pectina utilizada.

Las poligalacturonasas se pueden clasificar en 2 grupos según su modo de ruptura:

2.1.- Endopoligalacturonasas (EC 3.2.1.15) (endoPG): Son producidas por multitud de hongos filamentosos (Caprari *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 1993, Vázquez *et al.*, 1993), bacterias (Fogarty y Kelly, 1983), por algunas levaduras y también por plantas superiores y algunos nematodos parásitos de plantas (Sakai *et al.*, 1993). Catalizan la ruptura hidrolítica al azar del enlace α -1,4-glicosídico del ácido poligalacturónico.

Como hemos dicho las endoPG son específicas del ácido péctico, si el grado de metilación del sustrato aumenta, la velocidad de degradación disminuye. Los grupos carboxilo libres parecen ser un requisito para su actividad catalítica (Jansen y McDonnell, 1945; Koller y Neukom, 1969). La velocidad de degradación también, ocurre con otras endo-enzimas, disminuye según se va acortando la cadena de sustrato. Hay incluso endoPG capaces de degradar el trímero, pero a mucha menor velocidad (Rexová-Benková y Markovic, 1976).



● galacturónico ● extremo reductor

Fig.-12- Mecanismo de acción de las endopoligalacturonasas

En general la endoPG tienen un pH óptimo bajo, de 4.0-6.0, incluso se han descrito enzimas con un pH óptimo de 2.5 y una temperatura óptima alta, de 30-40 °C (Kaji y Okada, 1969). No se han descrito otras propiedades específicas de estas enzimas, como por ejemplo la necesidad de coenzimas.

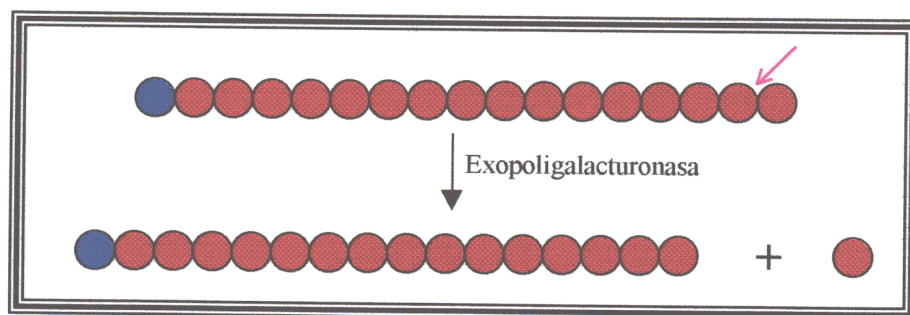
El ion calcio suele influir en la actividad de estas enzimas, aunque normalmente su acción es inhibitoria, se han descrito casos en los que estimula la actividad (Sakai et al., 1993). Las EndoPG, pueden ser constitutivas (Wimborne y Rickard, 1978), aunque lo normal es que sean inducibles (De Lorenzo *et al.*, 1987), produciéndose la inducción por pequeñas cantidades de pectina, oligómeros o galacturónico (Cooper y Wood, 1975; Capreri *et al.*, 1993). Algunas endoPG son sensibles a la represión catabólica (Maldonado *et al.*, 1989).

2.2.- Exopoligalacturonasas (EC.3.2.1.67) (ExoPG). Catalizan la ruptura hidrolítica de un modo secuencial del enlace α -1,4-glicosídico del ácido poligalacturónico comenzando por el extremo no reductor de la cadena.

Las exoPG son menos frecuentes, o quizás no se han estudiado todavía con la profundidad de las endoPG. Sólo han sido descritas en hongos y bacterias, siendo su modo de acción diferente según su procedencia. Las exoPG de hongos producen el monogalacturónico como principal producto final y su pH óptimo va de 4,0 a 6,0. Estas enzimas se conocen como 1,4- α -galacturonidasa o exoPG1. Las exoPG bacterianas, producen digalacturónico como principal producto final. Comúnmente se designan como

exo-poli- α -galacturonidasa o exoPG 2 (Sakai *et al.*, 1992). Ambas degradan siempre el sustrato comenzando por el extremo no reductor.

En contraste con las endoPGs, las exoPGs pueden degradar el dímero, lo que hace que este sea el sustrato más adecuado para diferenciar este tipo de enzimas



● galacturónico ● extremo reductor

Fig.-13.- Mecanismo de acción de las exopoligalacturonasas de hongos

Con respecto a las otras características de estas enzimas como la inducción, represión o inhibición, son muy parecidas a las endoPGs. Para distinguir ambas enzimas sólo se necesita comparar los datos obtenidos de reducción de la viscosidad, con los de azúcares reductores. Las endoPG se caracterizan por una fuerte reducción de la viscosidad del sustrato (50 %), sin apenas liberar azúcares reductores (2-3 %). Las exoPGs sin embargo necesitan hidrolizar al menos un 30 % de enlaces glicosídicos para obtener el 50 % de reducción de la viscosidad.

I.3.1.b.-Celulasas

Las celulasas de origen fúngico se pueden clasificar en 3 grupos: el primero comprende las exoglucanasas o celobiohidrolasas que atacan las moléculas de celulosa comenzando por el extremo no reductor, liberando secuencialmente subunidades de celobiosa, el segundo las endo- β -1,4-glucanasas, que rompen al azar los enlaces glicosídicos del interior de la cadena de celulosa y por último las β -glucosidasas que hidrolizan celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular. En sentido estricto sólo los

dos primeras se consideran celulasas; las últimas participan en la degradación de la celulosa al hidrolizar la celobiosa que inhibe a la celobiohidrolasas por ser su producto final. Cada grupo contiene multitud de isoenzimas. Las enzimas celulolíticas muestran sinergismo (Høj y Fincher, 1995), se requiere la actuación de los tres grupos de enzimas para conseguir la degradación completa de la celulosa. Este proceso suele ser muy lento, ya que el polímero de celulosa tiene naturaleza cristalina. Aunque estas enzimas se han descrito en multitud de hongos fitopatógenos (Bodenmann *et al.*, 1985; Kollar, 1994), los estudios referentes a su papel en la patogénesis son muy limitados (Cooper 1984; Sposato *et al.*, 1995).

I.3.1.c.- Enzimas que degradan la matriz neutra de polisacáridos.

Muchas de las enzimas que se encuentran en los tejidos infectados se incluyen dentro de las **enzimas que degradan la matriz neutra de polisacáridos**, aunque existe muy poca información sobre ellas. Las xilanasas son las enzimas más estudiadas de todas las que degradan la matriz neutra de polisacáridos. En plantas monocotiledóneas, donde el arabinoxilano es el principal componente de la matriz de la pared, las arabinasas y xilanasas desempeñan un papel análogo al de las enzimas pécticas en dicotiledóneas. Por ejemplo la xilanasasa es la primera enzima secretada por *Rhizoctonia cerealis* cuando infecta semillas de trigo (Cooper *et al.*, 1988). Las xilanasas de hongos juegan también un papel muy importante, como elicitores de las respuestas de defensa en las plantas. Inducen la producción de fitoalexinas (Farmer y Helgeson, 1987), la muerte celular (Bucheli *et al.*, 1990) y la producción de etileno (Fuchs *et al.*, 1989).

Del resto de las enzimas despolimerizantes de la matriz neutra hay muy pocos estudios, casi todas las investigaciones se han centrado en las xilanasas. En general todas ellas son inducibles y generalmente están sometidas a represión catabólica (Cooper y Wood, 1975).

I.4.- EL PAPEL DE LAS POLIGALACTURONASAS EN LA PATOGENESIS.

De todas las enzimas capaces de degradar polisacáridos, las poligalacturonasas actúan antes que otras puedan atacar a sus sustratos (Karr y Albersheim, 1970), son por lo

tanto, las primeras enzimas secretadas por ciertos patógenos cuando éstos crecen sobre paredes celulares aisladas (Jones *et al.*, 1972). Las poligalacturonasas “preparan” los componentes de las paredes celulares para su degradación por otras enzimas (English, 1972) y son capaces de inducir las respuestas de defensa en las plantas, mediante la liberación de fragmentos de la pared vegetal que inducen, por ejemplo, la síntesis de fitoalexinas (Bruce y West, 1982; Walker-Simmons *et al.*, 1983).

En hongos, a las enzimas que tradicionalmente se le ha prestado mayor atención es a las endopoligalacturonasas, ya que estas enzimas son capaces de macerar los tejidos de las plantas. Sin embargo las endoPGs liberan oligogalacturónidos con un alto grado de polimerización que actúan como elicitores de la respuesta de defensa de la planta (Davis *et al.*, 1984). La mayoría de los hongos patógenos de plantas producen también exopoligalacturonasas (Barthe *et al.*, 1981; Favaron *et al.*, 1988; Pérez Artes y Tena, 1990; Tenhaken y Barz, 1991; Vázquez *et al.*, 1993). Aunque su papel en la patogénesis no se ha estudiado con profundidad todavía, estas enzimas deben tener una función importante, ya que degradan los oligogalacturónidos, liberados por las endoPG, a monómeros inactivos como elicitores (Favaron, *et al.*, 1988), es decir se ha comprobado que para que un oligogalacturónido pueda actuar como elicitador necesita tener al menos 10 unidades de galacturónico (De Lorenzo *et al.*, 1996), el monómero y el dímero no serían por tanto capaces de actuar como elicitores.

La importancia de las poligalacturonasas en la patogénesis, está bien establecida para ciertas enfermedades de plantas, caracterizadas por una rápida y extensiva degradación de la pared celular (Bateman y Basham, 1976). El papel de las poligalacturonasas, aunque menos importante, también se reconoce en el caso de enfermedades causadas por biótrosos, donde sólo ocurre una mínima ruptura de la pared celular durante la penetración y colonización (Cooper, 1984).

Hay autores que defienden que la producción de PGs por hongos patógenos de plantas está asociada a su capacidad de atacar a su hospedador/es específico/s (Cervone *et al.*, 1981, 1986b). También se ha dicho que la producción y/o la actividad de las distintas poligalacturonasas, producidas por diferentes razas de patógenos pueden estar unidas con la especificidad de la relación raza-cultivar. (Cervone, *et al.*, 1986b).

El papel de las endoPGs en la patogénesis ha sido cuestionado por diferentes autores que han realizados experimentos de interrupción de genes de la endoPG (Scott-Craig *et al.*, 1990; Di Pietro *et al.*, 1998), y no detectan que se produzca una caída drástica en la virulencia. Sin embargo se conoce poco acerca de la expresión *in planta* de estas enzimas y puede ocurrir que el hongo este expresando otras PG s que no somos capaces de detectar *in vitro*. Además probablemente la patogénesis sea el resultado de la unión de varias actividades coordinadas entre sí que podrían compensar la ausencia de una de ellas con sobreexpresión de las otras.

Así con nuestro trabajo pretendemos contribuir a un mejor conocimiento de estas actividades para así poder saber algo más acerca de su papel en la infección y desarrollo de los síntomas de la enfermedad

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1.- ORIGEN Y MANTENIMIENTO DEL HONGO

En el presente trabajo se ha utilizado el aislamiento r₁₃ del hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radicis lycopersici* Jarvis y Shoemaker (Jarvis y Shoemaker, 1978), proporcionado por el Dr. Tello (INIA, Madrid). Fue obtenido a partir de cultivos monospóricos aislados a partir de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*.) infectadas.

El hongo ha sido mantenido en una estufa de cultivo a 25 °C, mediante resiembras periódicas en placas de agar patata dextrosa (PDA-Panreac). Posteriormente las placas se almacenaban en nevera a 4 °C. El cultivo se ha mantenido a largo plazo mediante la conservación de esporas en glicerol al 15%, a -20 °C y a -80 °C.

La capacidad de infectar plantas de tomate ha sido probada periódicamente según describen Sánchez y colaboradores (1975).

II.2.- CULTIVO DE LOS HONGOS.

II.2.1.-Medio inductor de pectinasas (Cruickshank, 1983).

El medio de cultivo contenía por litro de agua desionizada: 1 gr de NaOH, 3 gr de ácido málico, 2 gr de NO₃NH₄, 1 gr de H₂PO₄K, 0,1 gr de SO₄Mg x 7 H₂O y 5 gr de extracto de levadura. Las fuentes de carbono, suministradas a distintas concentraciones, fueron: pectina de manzana (Fluka) al 1%, ácido galacturónico (Sigma) del 0,1 al 1,5 %, ácido poligalacturónico al 1,5%, glucosa al 1,5%, 3% y 7,5% y paredes, extraídas de la raíz y el cuello (2 cm) de plantas de tomate, al 1%.

Los medios se esterilizaron en autoclave a presión durante 20 minutos a 120 °C

II.2.2.- Preparación de inóculos.

El inóculo está constituido por una pieza de 8 mm de diámetro de micelio joven (7 días a 28 °C) sobre PDA.

II.2.3.- Cultivo en medio inductor.

El hongo se cultivó en estático a 28 °C, en matraces Erlenmeyer de 100 ml, con 20 ml de medio de cultivo.

El micelio se eliminó mediante filtración a través de papel Whatman, conservándose los líquidos de cultivo a -20°C , para ser utilizados como extractos enzimáticos en las posteriores valoraciones.

II.3.-DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

II.3.1.-Peso seco del micelio.

Para estimar el peso seco, el micelio se separó por filtración del líquido de cultivo y se mantuvo a 65°C hasta obtener un peso estable.

II.3.2.- pH.

Para la medición del pH se utilizó un pH-metro Crison (modelo 2001). Para medir el pH en los geles de poliacrilamida se utilizó un electrodo de contacto (modelo Ingold 10 453 3033).

II.3.3.- Sustancias reductoras. Actividad poligalacturonasa.

La cantidad de sustancias reductoras presentes en una muestra problema se determinó usando el método de Somogyi (Somogyi, 1952) y Nelson (Nelson, 1944). Este método se basa en la oxidación de azúcares y sustancias reductoras por compuestos orgánicos cúpricos en solución alcalina.

El sustrato utilizado fue ácido poligalacturónico al 0,1 % (p/v), en tampón acetato 50 mM, pH 5,2. Las mezclas de reacción que contenían 50 μl de extracto enzimático y 50 μl de sustrato, se incubaron 30 minutos a 37°C . Las determinaciones fueron siempre acompañadas de blancos de sustrato y de los líquidos de cultivo.

Previamente se determinó que la respuesta era lineal hasta una concentración de glucosa anhidra 1 mM. El rango de concentraciones abarcadas fue el comprendido entre 0,01 y 0,1 mg/ml. La ecuación de la recta obtenida fue:

$$A_{540} = 0,78 + 0,015 (r = 0,99)$$

Una unidad de actividad enzimática (UAE) se definió como la cantidad de enzima que libera un μmol de azúcares reductores por ml y por minuto.

II.3.4.-Proteínas en el líquido de cultivo.

Las proteínas se valoraron según el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo y el procedimiento de Bio-Rad. Este método se basa en el cambio de absorción de 465 nm a 595 nm que experimenta una solución ácida de “Coomassie Brilliant Blue” al unirse a las proteínas. Los datos de absorbancia fueron referidos a una curva patrón con albúmina de suero bovino de una concentración de 400 y $5\mu\text{g/ml}$ (ensayo estándar y microensayo). Con anterioridad se comprobó que la lectura del espectrofotómetro aumentaba linealmente hasta una concentración de 800 y $10\mu\text{g/ml}$ respectivamente, siendo las rectas de regresión para ambos casos:

$$A_{595} = 0,0009 + 0,0568 \quad (r = 0,99) \text{ Ensayo estándar}$$

$$A_{595} = 0,0361 + 0,0103 \quad (r = 0,99) \text{ Microensayo}$$

II.3.5.- Valoración de la glucosa.

Para medir la glucosa se utiliza el equipo de análisis de Boehringer Mannheim “Gmbh GOD-period”.

Siguiendo el protocolo se elaboró una recta patrón con glucosa para el rango de concentraciones de 2,77 mM a 0,277 mM. El tiempo de reacción fue de 50 minutos. La recta de regresión obtenida es:

$$A_{610} = 0,028 + 0,5508 [\text{Glucosa}] \text{ mM} \quad (r = 0,99)$$

II.3.6.- Soluciones tampón.

La mayoría de las soluciones tampón se prepararon siguiendo las tablas Geigy (Geigy, 1965) que consisten en mezclar 2 soluciones, una ácida y otra básica, en distintas proporciones según el pH deseado.

El tampón fosfato salino (PBS) se preparó mezclando 1,5 mM de KH_2PO_4 , 8,5 mM de Na_2HPO_4 , 2,7 mM de KCl y 140 mM de NaCl (concentración final).

El Tampón TRIS salino (TBS) se preparó con TRIS HCl 50 mM pH 7,5 y 0,5 M de NaCl.

II.4.- MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

II.4-1.- Ultrafiltración.

La ultrafiltración separa macromoléculas disueltas en un fluido basándose en su tamaño molecular, la conformación y la carga de las moléculas pueden afectar a su rendimiento.

Filtración tangencial

Las proteínas del líquido de cultivo fueron concentradas por filtración tangencial mediante membranas de 10 kDa (Filtros de membrana minisette, Filtron). Este método posee la ventaja de crear unas corrientes tangenciales que facilitan el efecto de “barrido”, minimizando el efecto de la concentración, que en otros casos hace que se colapse el filtro. El flujo tangencial es proporcionado por una bomba peristáltica.

Filtración no tangencial

Es un método de ultrafiltración mediante células con agitación. Las membranas utilizadas fueron de 30 kDa (Millipore). La filtración se realiza mediante la presión proporcionada por una bombona de nitrógeno.

II.4.2.- Precipitación con ácido tánico.

La precipitación se realizó añadiendo a la muestra problema una solución de ácido tánico hasta una concentración final del 1% (Shibata y Nisizawa, 1965). Se dejó 1 hora a 4 °C y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g. El precipitado se lavó 3 veces con acetona para que se eliminasen los restos de ácido tánico.

II.4.3.- Precipitación con sulfato amónico.

La precipitación se realizó añadiendo, lentamente a la muestra problema, la cantidad necesaria de sulfato amónico para alcanzar una concentración final de 60, 75 y 90%. Una vez añadida la totalidad del sulfato amónico se mantuvo 1 hora en agitación a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 10000 g. durante 10 minutos. Para su posterior utilización, el precipitado se disolvió y dializó para eliminar los restos de sulfato amónico.

II.4.4.- Precipitación con solventes orgánicos.

Precipitación con acetona

A un volumen determinado de muestra se le añadió acetona hasta obtener una concentración final del 30, 60 y 80%, se mantuvo en el congelador durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 10000 g. durante 10 minutos. Finalmente el precipitado se dejó secar en un liofilizador.

Precipitación con etanol

Se procedió de manera similar a la precipitación con acetona. La concentración final de etanol fue del 30, 60 y 80%.

II.5.- DIÁLISIS.

Entre todos los pasos llevados a cabo durante el proceso de purificación de la proteína y cada vez que se necesitó medir la actividad poligalacturonasa o la concentración de proteínas, se realizaron diálisis. Estas se llevaron a cabo a 4 °C, en bolsas de diálisis cuyo límite de exclusión es 10 kDa. Las diálisis se realizaron frente a agua destilada o frente a tampón adecuado.

II.6.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

I.6.1.- Cromatografía líquida.

La cromatografía líquida es capaz de separar moléculas atendiendo a diferentes parámetros físicos o químicos como el peso molecular, carga, punto isoeléctrico, interacciones hidrófobas... Es una de las técnicas más utilizadas en la purificación de proteínas.

II.6.1.1.- Exclusión molecular: se basa en la separación de moléculas por su peso molecular. Para la purificación de la actividad poligalacturonasa se utilizó un equipo de baja eficacia. La capacidad de la columna era 320 ml, la fase estacionaria fue Bio-Gel P-100 (Bio-Rad) y la fase móvil tampón succinato 20 mM pH 5,0.

La columna se calibró con azul de dextrano resultando ser el volumen de exclusión de la misma de 32 ml.

La columna fue empaquetada a un flujo de 0,25 ml/min. y corrida a un flujo de 0,20 ml/min. El volumen de las fracciones recogidas fue de 2 ml (50 gotas).

II.6.1.2.- Intercambio iónico: se basa en la separación de moléculas por su punto isoeléctrico utilizamos dos tipos de sistemas:

- Sistemas de baja eficacia: Utilizamos DEAE Bio-Gel (Bio-Rad) que es un intercambiador aniónico con grupos funcionales con dietilaminoetil. El gel fue equilibrado con tampón acetato 50 mM pH 7,5. A este pH la actividad poligalacturonasa no se retiene en el gel, sino que sale excluida. El paso a través del gel se realizó por filtración conectando el equipo de filtración a una bomba de vacío.
- Sistemas de alta eficacia: este tipo de columna se utilizó también en la purificación de la poligalacturonasa. La columna elegida fue Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) y como fase móvil se utilizó tampón fosfato 10 mM pH 8,2. El flujo utilizado fue 0,8 ml/min. Tras aplicar la muestra, las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas con un gradiente lineal de cloruro sódico de 0 a 1,0 M realizado en 30 minutos. El equipo cromatográfico utilizado consta de los siguientes elementos: un inyector Rheodyne 7125, una bomba de gradiente de Pharmacia LKB 2249, un detector de longitud de onda variable de Pharmacia LKB (WM.2141) y como integrador el paquete informático HPLC-Manager (Versión 1.0) y Nelson (5.5.5)

II.6.2.- Cromatografía en capa fina.

Se realizó en placas de celulosa con dimensiones de 20x20 cm y 0,1 mm de espesor, según el método descrito por Ried y Collmer (1986). Esta técnica fue utilizada para identificar los productos de la reacción catalizada por las poligalacturonasas.

El sustrato utilizado fue ácido poligalacturónico al 0,1 % (p/v), en tampón acetato 50 mM pH 5,2. La muestra estaba formada por una mezcla equitativa de sustrato y solución enzimática. Ésta fue incubada a 37 °C durante diferentes tiempos. Como patrones se utilizaron ácido monogalacturónico, ácido digalacturónico y ácido trigalacturónico, al 0,1 % (p/v), en el tampón anteriormente descrito.

El solvente utilizado consistió en una solución de butanol-acético-agua (5:2:3 v/v) y la solución reveladora estaba formada por 200 ml de etanol al 96%, 24,22 mg de Tris y 0,11 gr. de azul de bromofenol.

El procedimiento fue el siguiente: se aplicaron 20 µl de las muestras problema, a distintos tiempos de incubación, en las placas. Posteriormente la placa se introdujo en posición vertical, en una cubeta que contenía el solvente. El desarrollo se realizó durante 5 horas a 37 °C, repitiéndose el proceso al día siguiente para mejorar la resolución. Tras dejar secar las placas a temperatura ambiente, se introdujeron en la solución reveladora durante unos minutos. Los productos de la reacción enzimática aparecen como bandas amarillas sobre el fondo azul de la placa.

II.7.- TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

II.7.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las electroforesis se realizaron utilizando la cubeta “Miniprotean II” de Bio-Rad, con geles de 1mm de espesor. Se llevaron a cabo en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), según el método descrito por Laemmli (1970). Este sistema consta de 2 geles (electroforesis discontinua), un gel separador que se polimeriza primero y un gel concentrante que se polimeriza en la parte superior, cuyas composiciones son:

- Gel de separación (10%): se mezclan 2,5 ml de Tris-HCL 1,5 M pH 8,8, 3,25 ml de acrilamida (29%)-bisacrilamida (0,8%), 50µl de persulfato amónico, 5µl de

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) y 100 μ l de SDS (dodecil-sulfato sódico), llevándose a un volumen final de 10 ml con agua destilada y desionizada.

- Gel de concentración: se mezclan 2,5 ml de Tris-HCL 0,5-M, pH 6,8, 1,3 ml de acrilamida (29%)-bisacrilamida (0,8%), 50 μ l de persulfato amónico, 10 μ l de TEMED 100 μ l de SDS. Como en el caso anterior se llevó a un volumen final de 10 ml.

Las muestras se disolvieron en tampón de muestra que estaba compuesto por 4 mL de agua destilada, 1 ml de Tris-HCL (pH 6,8, 0,5M), 0,8 ml de glicerol, 1,6 ml de SDS, 0,4 ml de β -mercaptoetanol y 0,2 ml de azul de bromofenol al 0,05%. Tras disolverlas se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 10000 g 1 minuto. El tampón de electroforesis se preparó mezclando 3,02 g de Tris-base con 14,4 g de glicina y con 1g de SDS por litro de agua.

El potencial aplicado para correr las muestras fue 80 V hasta que entraba la muestra en el gel separador y 120 V durante su desplazamiento en la fase separadora.

Para la determinación del peso molecular de la poligalacturonasa se utilizaron los marcadores de peso molecular de amplio rango preteñidos o sin preteñir de Bio-Rad. Los patones sin preteñir eran miosina (208 kDa), β -galactosidasa (115 kDa), fosforilasa B (97,4 kDa), BSA (79,5 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) y los preteñidos eran, miosina (208 kDa), β -galactosidasa (115 kDa), BSA (79,5 kDa), ovoalbúmina (49,5 kDa), anhidrasa carbónica (34,5 kDa), inhibidor de la tripsina (28,3 kDa) y lisozima (20,4 kDa).

II.7.2.- Isoelectroenfoque analítico.

Se realizó en geles de poliacrilamida al 5%, según el método descrito por Grog *et al.* (1980). El equipo utilizado fue Model 111 mini IEF cell de Bio-Rad. El gel utilizado fue de 0,4 mm de espesor y su composición era: 2,5 ml de acrilamida (29%)-bisacrilamida (0,1%), 0,5 ml de anfolitos (Bio-Rad) de distintos rangos de pH, 1,6 ml de glicerol al 25%, 50 μ l de persulfato amónico al 10% y 5 μ l de TEMED. Se completó con agua hasta un volumen final de 10 ml.

Las muestras fueron aplicadas sobre papel Whatman nº 3 y colocadas sobre el gel lo más alejadas posible de su punto isoeléctrico, para conseguir un mejor enfoque de las proteínas.

Las condiciones del enfoque fueron las siguientes: preenfoco 15 minutos a 125 V, esto permite la distribución de los anfolitos en el gel. 15 minutos a 100 V, tras colocar las muestras sobre los aplicadores. 15 minutos a 200 V, posteriormente se quitan los aplicadores y se deja 1 hora a 450 V.

El gradiente formado se midió con un electrodo de superficie (ingold 10 453 3003).

II.7.3.- Electroelución

La electroelución es una técnica que permite recuperar ADN o proteínas a partir de geles de poliacrilamida o agarosa. Para electroeluir proteínas se utilizó el modelo 422 Electro-eluter de Bio-Rad. Después de realizar la electroforesis se localizó la banda de la poligalacturonasa, mediante marcadores de peso molecular y ensayos con anticuerpos. La banda de poligalacturonasa se separó del resto cortando esa porción de gel. Los trozos de acrilamida así obtenidos se colocaron sobre un tubo de vidrio, que en el extremo lleva un filtro poroso (para impedir el paso de la acrilamida). Y una cápsula con la membrana de ultrafiltración donde queda retenida la proteína.

Tras rellenar éstos con tampón de electroforesis y cubrir los electrodos con este mismo tampón se aplicó un potencial de 10 V/tubo durante 5 horas. Pasado este tiempo la proteína se recuperó de la cápsula para poder ser utilizada.

II.8.-MÉTODOS DE TINCIÓN

II.8.1.- Tinción de proteínas.

- Azul de Coomasie R-250: Finalizada la electroforesis, el gel se introduce en una solución de Coomasie R-250 al 0,002%, metanol al 46% y ácido acético al 7,6%. Tras 1 hora aproximadamente se destiñe con una solución de metanol-acético-agua (30:10:60)

- **Tinción de Plata:** esta tinción se realizó, como en el caso anterior, después de la electroforesis siguiendo las instrucciones del kit “Silver Stain Plus” de Bio-Rad.

II.8.2.- Tinción de actividad por incubación en el sustrato.

Finalizado el isoelectroenfoque los geles se lavaron con tampón acetato 50 mM pH 5,2 durante 15 minutos. Posteriormente se incubaron en una solución de pectina al 1% en el mismo tampón, durante diferentes tiempos a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo los geles se mantuvieron toda la noche en agitación en una solución de rojo de rutenio al 0,02%. Posteriormente se lava con agua destilada.

Las bandas de actividad poligalacturonasa aparecerán como bandas blancas sobre el fondo rosa del gel y las de actividad pectinesterasa aparecerán como bandas de color rojo fuerte sobre dicho fondo.

II.9.- TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A FILTROS DE NITROCELULOSA.

Para la transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa se utilizó la técnica de “Western-Blot”. Esta técnica se realizó con el sistema “Mini-Trans-Blot Electrofophoretic Transfer Cell” de Bio-Rad. Antes de que finalice la electroforesis según se describe en el apartado II.7.1, se sumergen los papeles Whatman 3M, las esponjas y los filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BA 85 de 0,45 μ m) en tampón de transferencia (3,02 g de Tris-base con 14,4 g de glicina y metanol (Merck) al 20%, por litro de agua destilada). Una vez finalizada la electroforésis se lava un minuto el gel en el tampón de transferencia anteriormente descrito.

Colocación: Sobre el polo negro (negativo) del equipo de transferencia se coloca la esponja, 1 papel whatman, el gel, la membrana de nitrocelulosa, el otro papel whatman y la otra esponja. El montaje debe hacerse con guantes y hay que eliminar cuidadosamente todas las burbujas.

La transferencia se llevó a cabo a 4 °C, en agitación, durante 45 minutos a un voltaje constante de 100 V .

II.10.- CARACTERIZACIÓN DE LA POLIGALACTURONASA.

II.10.1.- **Determinación de la naturaleza glicoproteica de la proteína.**

Para saber si la poligalacturonasa era una glicoproteína se utilizó el método de Hsi y colaboradores (1991), con esta técnica se detectan manosas terminales, que son muy comunes en hongos y vegetales. Después de aplicar distintas concentraciones de la proteína purificada, directamente sobre un filtro de nitrocelulosa, la membrana se lavó durante 1 hora con solución bloqueante (TBS + polivinilpirrolidona-360 al 2%), posteriormente se incubó durante 1 hora en concanavalina A lecitina-biotinilada (10 µg /ml) en la solución bloqueante. Transcurrida la hora se lavó, 3 veces durante 10 minutos, con TBS/0,1% Triton X-100 (TTBS) y se incubó durante 1 hora con el reactivo Vectastain ABC (Avidina, biotinilada-HRPO, laboratorios Vector), diluida 1:400 en la solución bloqueante). Transcurrida la hora se lavó nuevamente con TTBS (3 lavados de 10 minutos).

Para revelarlo se utilizó una solución que contenía TBS (10 ml) y un sustrato de la peroxidasa, la diaminobencidina (5 mg), que al ser oxidada por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (3 µl de H₂O₂ al 30%) producía manchas de color marrón de distinta según el contenido en carbohidratos.

II.10.2.- **Contenido en carbohidratos.**

Para valorar los hidratos de carbono totales se utilizó el método de Trevelyan y Harrison (1952), basado en la formación de derivados de furfural, a partir de los azúcares al añadir ácido sulfúrico. El reactivo contiene 0,2 g de antrona en 100 ml de sulfúrico 14 M. El procedimiento seguido fue el siguiente: a 0,2 ml de muestra se le añadió 1 ml de reactivo. La muestra se hierve durante 10 minutos, se deja enfriar y se lee a 660 nm. Tras restar el blanco del reactivo los valores se convierten en equivalentes de glucosa, utilizando como patrón estándar una concentración 0,5 mM de dicho azúcar. Con anterioridad se había comprobado que la respuesta del espectrofotómetro era lineal hasta una concentración 1 mM de glucosa, siendo la ecuación de regresión obtenida:

$$[Y]_{mM} = -0,102 + 1,479 A_{660}$$

II.10.3.- Desglicosilación.

La desglicosilación se realizó con la enzima endo- β -N acetilglucosaminidasa H (endo-H, Boehringer), que libera los oligosacáridos unidos a la proteína por enlace N-glicosídico, al hidrolizar el enlace entre los restos de N-acetilglucosamina que unen el oligosacárido a las asparaginas de la proteína (Tarentino y Maley, 1974).

La desglicosilación se realizó con la poligalacturonasa purificada y desnaturalizada. Para ello la proteína purificada se hirvió durante 5 minutos con SDS al 0,06% y β -mercaptoetanol 0,1 mM.

La reacción de desglicosilación se llevó a cabo en tampón acetato 50 mM, pH 5,5 y azida sódica al 0,02%. La endo-H se añadió a una concentración final de 125 mU/mg de proteína y la mezcla de reacción se incubó durante 16 horas a 37 °C. Los resultados de la desglicosilación se pusieron de manifiesto tras realizar una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y comparar el peso molecular de la proteína nativa y desglicosilada.

II.10.4.-Determinación del amino terminal de la proteína.

La determinación del extremo amino terminal de la poligalacturonasa se llevó a cabo mediante la degradación de Edman. Se utilizó un secuenciador de proteínas, de pulso líquido, modelo 494, y un analizador de PTH (feniltiohidantoina) en serie, modelo Procise TM, ambos de Applied Biosystem. La muestra analizada consistió en 20 μ g de la poligalacturonasa purificada por electroelución (apartado II.7.4) y desglicosilada según se indica en el apartado II.10.3.

II.10.5.- Determinación de la secuencia de un péptido interno de la poligalacturonasa.

Se hidrolizaron 200 μ g de proteína, purificada por electroelución (apartado II.7.4) y desglicosilada, según las indicaciones señaladas en el apartado II.10.3, con tripsina (10 μ g) en NH_4HCO_3 (0,4 M), a 37 °C durante 24 horas. Los péptidos obtenidos fueron separados mediante una columna C18 (Hichrom) usando un gradiente de 0-70% de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoracético (flujo 1 ml/min). La secuencia

amino terminal del péptido fue obtenida siguiendo el mismo protocolo utilizado para la secuenciación del amino terminal.

II.10.6.- Análisis de aminoácidos.

Para determinar la composición en aminoácidos de la poligalacturonasa se realizó una hidrólisis ácida con HCL 6 N 110 °C, durante 24 horas. La proteína (20 µg), purificada por electroelución (apartado II.7.4) y desglicosilada según se indica en el apartado II.10.3, se disolvió en tampón y se analizó por FPLC utilizando el modelo Biochrom 20 de Pharmacia. La detección se realizó con ninhidrina.

II.11.- OBTENCIÓN DE UNA SONDA PARA LA ENZIMA EXOPOLIGALACTURONASA.

La sonda específica para la exopoligalacturonasa fue obtenida mediante amplificación por PCR sobre DNA genómico de FORL r₁₃ usando cebadores específicos. Estos cebadores se diseñaron basándonos en las secuencias del amino terminal y del péptido interno respectivamente y presentan las siguientes características: el oligonucleótido que correspondía al N-terminal fue: 5'AAGGTCTAYACTA TCMGMCA 3'. M tiene un 50 % de A y un 50 % de C e Y tiene un 50 % de T y un 50 % de C. El oligonucleótido que correspondía al péptido interno fue: 5'TCYTTGATRTCGACCCAVGC 3'. R tiene un 50 % de G y un 50 % de A. V puede ser C, G o A. Estos dos oligonucleótidos fueron sintetizados por Cruachem Ltd (Glasgow-Escocia).

El DNA genómico se extrajo a partir de 1,5 g micelio congelado a -80 °C de 6 días mediante el procedimiento diseñado por Dellaporta *et al.*, 1983.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador (Peltier PTC-100, M.J. Research Inc.). El programa utilizado para la amplificación de un fragmento de exoPG consistía en: 28 ciclos (1 minuto a 94 °C - desnaturalización - , 1 minuto a 55 °C - anillamiento- 2 minutos a 72 °C – extensión -) seguido de 5 minutos a 72 °C para la extensión final.

Para la extensión se utilizó la Taq polimerasa (EcoGen), según las instrucciones del fabricante, 2 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada nucleótido, 1 μM de cada oligonucleótido usado como cebador y 500 ng de ADN en un volumen final de 30 μl .

El producto de la reacción de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 1 % en 1x TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1mM a pH 8,0) y bromuro de etidio ($1\mu gml^{-1}$). La banda del producto obtenido, de aproximadamente 750 pb de longitud, fue cortada y su DNA extraído utilizando el kit USBioclean (Amersham Life Science) según las instrucciones adjuntas.

El fragmento de DNA extraído y purificado, se clonó con el kit pMOS blue (Amersham Life Science) para productos de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante. La selección de colonias se realizó creciendo las células a 37 °C durante una noche en placas de LBA (LB más ampicilina, 50 mg/ml) con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido e isopropil-tio- β -D-galactósido.

Las colonias blancas se crecieron en 1,5 ml de LBA una noche a 37 °C y 250 rpm para extraer el DNA plasmídico. Una vez extraído el DNA plasmídico, según Sambrook *et al.*, 1989, se comprobó que plásmidos tenían el inserto deseado. Para ello, una parte fue digerida con EcoRI (1 unidad por reacción) y RNasa A+T1 en el tampón indicado por el fabricante (Amersham Life Science) a 37 °C y cargada en gel de agarosa al 0,8 % en TAE y bromuro de etidio ($1\mu gml^{-1}$).

II.12.- SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

Una de las colonias con el inserto del tamaño deseado se creció de nuevo y el DNA plasmídico se extrajo y purificó usando el kit de “purificación de DNA plasmídico” de Boehringer Mannheim.

Las secuenciaciones se realizaron en la Unidad de Secuenciación automática de la Universidad Complutense de Madrid en un secuenciador de DNA ABI PRISM (Pelkin Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenida la secuencia, se comparó con las presentes en el “Genebank” que utiliza el programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1990).

II.13.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA POLIGALACTURONASA.

Los anticuerpos policlonales se obtuvieron inmunizando un conejo de raza neozelandesa. Como antígeno se utilizó la poligalacturonasa purificada por electroelución (apartado II.7.4). Las 3 dosis de antígeno que se inyectaron, se espaciaron 15 días. La primera dosis consistió en 125 µg de proteína disuelta en PBS mezclada con el adyuvante completo de Freund (Berhring), en proporción 1:3. Fue inyectada por vía subcutánea. Las otras dos dosis estaban formada por 125 µg de proteína en PBS mezclado con el adyuvante incompleto de Freund, en proporción 1:3 y fueron inyectadas por vía intramuscular. Transcurridos 45 días se extrajeron 10 ml de sangre de la oreja del conejo y se valoró la titulación del suero mediante la técnica descrita en el apartado II.12. Una vez vista la titulación de anticuerpos se desangró el conejo y la sangre se dejó coagular a 37 °C durante 1 hora. El coágulo se separó de las paredes con una pipeta Pasteur y se dejó contraer durante varias horas a 4 °C. finalmente el suero se recogió mediante centrifugación y se conservó en alícuotas congeladas a -20 °C.

II.14.- INMUNODETECCIÓN DE LA POLIGALACTURONASA

Se realizó una electroforesis como se describe en el apartado 7.1, cargando distintas cantidades de antígeno (entre 0,25 y 1,5 ng de proteína purificada y de 30 a 50 ng de extractos enzimáticos procedentes del crecimiento en distintas fuentes de carbono o de extractos de planta). Después de la electroforesis se realizó la transferencia a filtros de nitrocelulosa como se describe en el apartado II.9. Una vez finalizada la transferencia los filtros se bloquearon, para evitar la unión inespecífica a proteínas, con leche desnatada al 5% en PBS, en agitación, durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se mantiene toda la noche con el anticuerpo anti-poligalacturonasa a una concentración 1:10000 en la misma leche. Después de lavarlo, con PBS, 3 veces durante 10 minutos, el filtro se incubó durante dos horas con el anticuerpo anti-inmunoglobulina G de conejo ligado a peroxidasa (Nordic immunological laboratories) a una concentración 1:5000 en leche-PBS. Para revelarlo se utilizó una solución que contenía PBS (40 ml) y dos sustratos de la peroxidasa diaminobencidina (10 mg en 5 ml de metanol) y 4-cloro1-naftol (15mg en 5 ml de metanol), que al ser oxidados por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (10µl de H₂O₂ al 30%) producía manchas de color marrón de distinta según el contenido en carbohidratos.

II.15.- DT-IBA (DIRECT TISSUE-BLOTTED IMMUNOBINDING ASSAY).

Esta es una técnica descrita por Arie *et. al.*, 1995. Se realizó para comprobar si la PG se producía en tejidos de raíz infectada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Para ello se utilizaron raíces control e infectada de 14, 21 y 28 días cedidas por la Dra. Teresa Rodríguez del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología (UCM).

Esta técnica consiste en el contacto directo de una sección de la raíz sobre una membrana de transferencia previamente equilibrada en PBS. Tras el contacto (unos segundos) la membrana se bloquea, se realizó la reacción con los anticuerpos y se reveló como se describe en el apartado II.14.

II.16.- INOCULACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE.

La inoculación de las plantas y las extracciones de proteínas de raíz las realizó el equipo de la Dra. Teresa Rodríguez del Dpto. de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la UCM.

El material vegetal utilizado fueron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Precodor (S&G, semillas S.A) susceptible a *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Las condiciones de cultivo e inoculación usadas fueron las descritas por De cal *et al.*, 1997. Se inocularon plantas de 10 días con una suspensión de microconidios en agua, siendo la concentración final de microconidios 10^4 microconidios/ml.

Para la extracción se utilizó un tampón neutro (tampón fosfato pH 6,8 0,1 M, NaCl 1M, DDT 10mM). Las raíces congeladas se homogeneizaron añadiéndole 10 ml de tampón de extracción, posteriormente se centrifugó a 23000 g durante 30 minutos. Tras la filtración del sobrenadante, las proteínas se precipitaron con sulfato amónico al 85% y se centrifugaron a 23000 g durante 30 minutos. Los precipitados así obtenidos se resuspendieron y se dializaron frente a glicina al 1%. Los extractos dializados se liofilizaron y guardaron a -20 °C hasta su utilización.

RESULTADOS

III.1.- DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES IDÓNEAS PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO Y LA PRODUCCIÓN DE POLIGALACTURONASAS.

En este apartado presentamos los resultados sobre las condiciones de cultivo para la producción de poligalacturonasas. Se valoró tanto el peso seco, como la actividad, las proteínas y el pH del medio a lo largo del crecimiento del hongo, en medio líquido, con las distintas fuentes de carbono utilizadas (glucosa, pectina de manzana, ácido poligalacturónico, ácido galacturónico y paredes de tomate).

Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

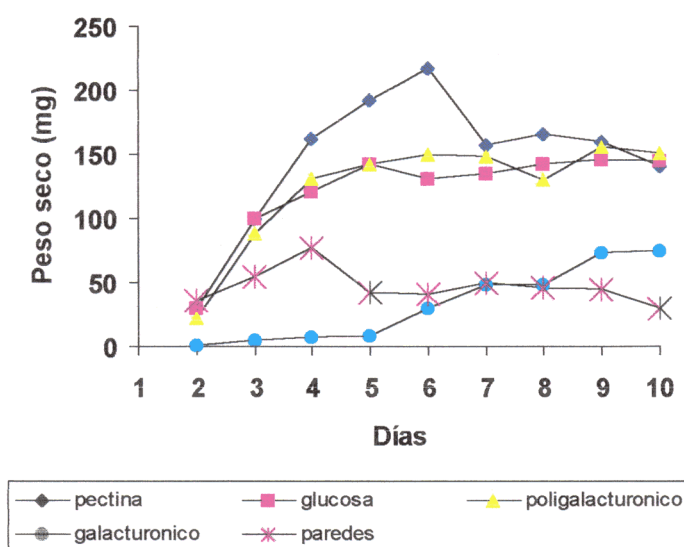


Fig.-1: Peso seco (mg), obtenido a lo largo del crecimiento, sobre las distintas fuentes de carbono.

Como podemos apreciar en la figura 1 el hongo crece mejor en pectina de manzana, su crecimiento también es bueno en glucosa y poligalacturónico. Sin embargo sobre paredes de tomate y sobre ácido galacturónico la masa micelial alcanzada es siempre inferior al 50% de la obtenida con otras fuentes de carbono.

A pesar de ser el galacturónico una fuente de carbono inductora citada habitualmente en la bibliografía, nosotros observamos que producía inhibición del crecimiento al menos a ciertas concentraciones. En la figura 2 podemos apreciar como hay una concentración crítica de galacturónico, el 1% P/V. Cuando esta fuente de carbono se incorpora a concentraciones superiores se produce una caída drástica tanto

de la actividad poligalacturonasa, como del peso seco y las proteínas. Los ensayos se realizaron tras 6 días de crecimiento sobre galacturónico.

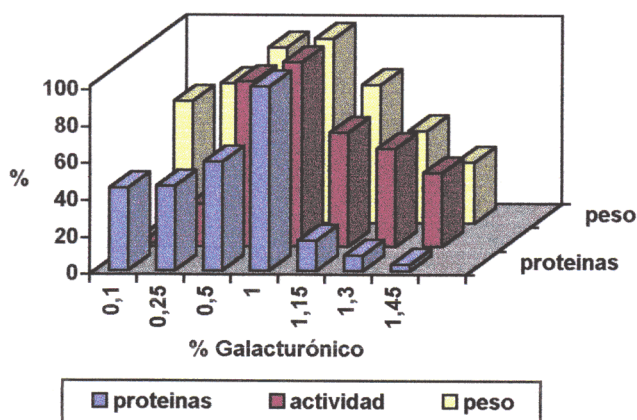


Fig.-2: Influencia de la concentración de galacturónico sobre el crecimiento, la actividad PG y las proteínas extracelulares

En cuanto a la actividad (Fig. 3) cabe destacar la ausencia total de la misma cuando el hongo crece sobre glucosa. Esto nos hace suponer que no se trata de una actividad constitutiva. En presencia de los distintos inductores se aprecia un aumento considerable de la actividad, siendo mayor en el caso de galacturónico (al 1%) y pectina. Cuando el hongo crece sobre pectina el máximo de actividad se alcanza el día 6 de crecimiento, mientras que en galacturónico se alcanza el máximo el día 9. Podemos observar una pequeña actividad apenas iniciado el crecimiento, especialmente cuando el hongo crece sobre pectina y paredes de tomate; aunque esta actividad cuantitativamente no parece relevante, posteriormente observaremos que presenta un comportamiento diferente a la PG del día de máxima actividad.

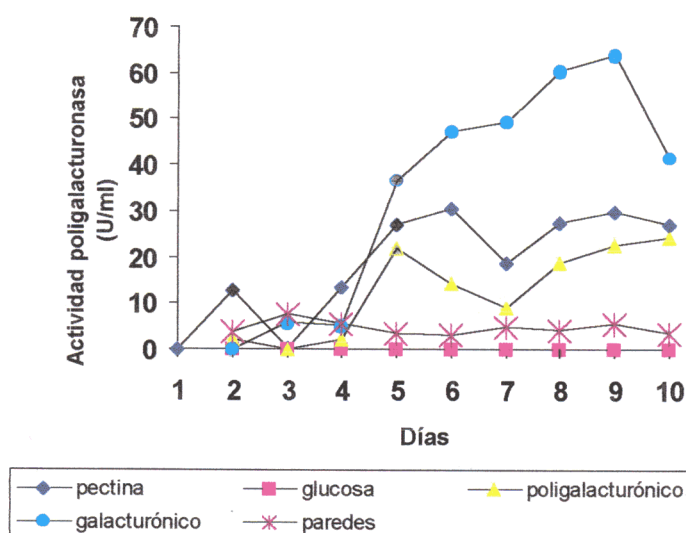


Fig.-3: Actividad poligalacturonasa (U/ml) a lo largo del crecimiento sobre las distintas fuentes de carbono.

Aunque el crecimiento y la actividad sobre paredes de tomate sean bajos, hay que tener en cuenta que la paredes de tomate que utilizamos están sin tratar, es decir en ellas la fracción péctica que es el inductor real, probablemente está poco accesible. Lo que creemos es importante es la tendencia que siguen las curvas.

Con todos los datos obtenidos en las figura 3 podemos deducir que la actividad poligalacturonasa es claramente inducible y que los mejores inductores de los ensayados son la pectina y el ácido galacturónico. Como hemos comentado las paredes de tomate prodrian ser también buen inductor, si se las sometiese a un pretratamiento y por tanto la fracción péctica estuviese más disponible y a una mayor concentración.

El pH (Fig. 4) va aumentando en todos los casos con el crecimiento, desde unos valores iniciales cercanos a 4,0 hasta unos valores próximos a 9,0 a partir del día 6 ó 7 de crecimiento, en todas las fuentes de carbono ensayadas, excepto en glucosa en la que el máximo valor alcanzado es de pH 7 y en galacturónico en el que se alcanza el valor de pH de 9,0 sólo el día 10 de crecimiento.

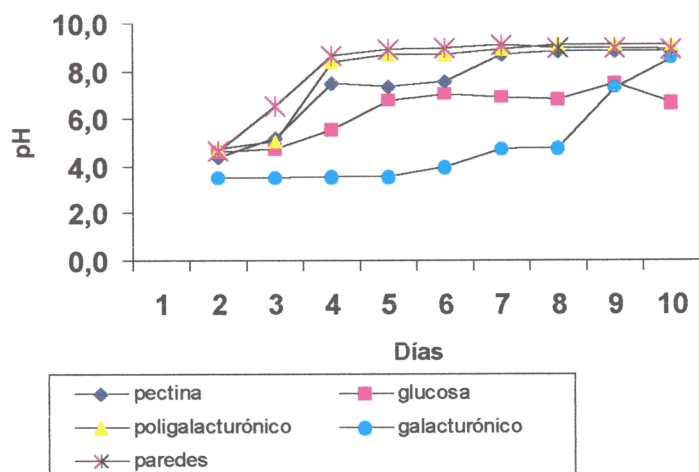


Fig.- 4: Evolución del pH a lo largo del crecimiento del hongo, sobre las distintas fuentes de carbono.

La cantidad de proteínas presentes en el líquido de cultivo se cuantificó a lo largo de todo el crecimiento, en las distintas fuentes de carbono. Los valores obtenidos se muestran en la figura 5.

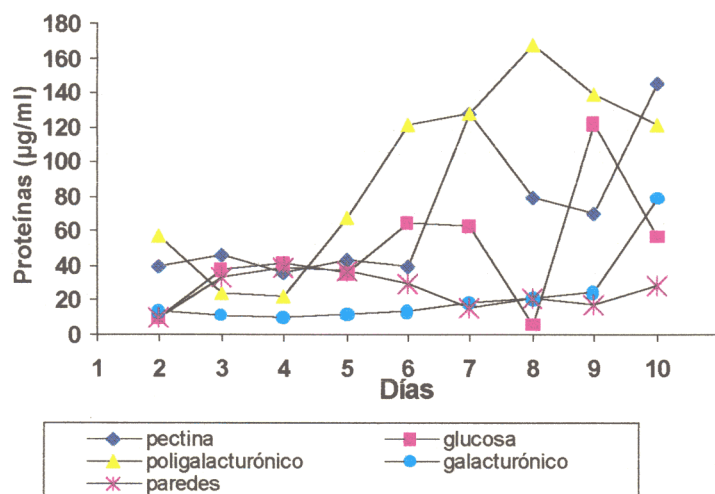


Fig.- 5: Concentración de proteínas (µg/ml) durante el crecimiento del hongo.

A la vista de los resultados obtenidos, parecía que las fuentes de carbono más adecuadas para la producción cuantitativa de actividad poligalacturonasa fueron la pectina y el ácido galacturónico, este último una vez solventados los problemas de concentración observados.

III.2.- ISOELECTROENFOQUES ANALÍTICOS.

La presencia de isoformas es una característica frecuente dentro de las poligalacturonasas y los patrones isoenzimáticos suelen modificarse en función de las condiciones de cultivo, ambientales incluso frente a diferente hospedador. Observamos la presencia de isoformas producidas en las distintas fuentes de carbono mediante isoelectroenfocos analíticos de los extractos con un rango de anfolitos de 3 a 10 y se tiñeron por actividad. En todos los casos se eligieron cuatro días donde se había detectado actividad como representativos del ciclo de crecimiento del hongo. Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 6, 7, 8 y 9.

En la figura 6 podemos ver como sobre pectina se producen tanto poligalacturonasas como pectinesterasas. En cuanto a las poligalacturonasas detectamos gran variedad de isoformas especialmente los días 4 y 6 de crecimiento. Las poligalacturonasas tienen unos puntos isoelectrónicos que van de 5,4 a 7,6 (pI de 5,4; 6,2; 6,8; 7,0 y 7,6), es decir podemos observar gran diversidad. Las pectinesterasas aparecen a lo largo de todo el crecimiento, así el día 2 aparece una pectinesterasa con un pI de

aproximadamente 3,5, un valor bastante ácido para estas enzimas. El resto de los días aparece una única banda con un punto pI de 8,9. En sólo 2 días el hongo es capaz de cambiar drásticamente de ácido a básico el patrón de PE.

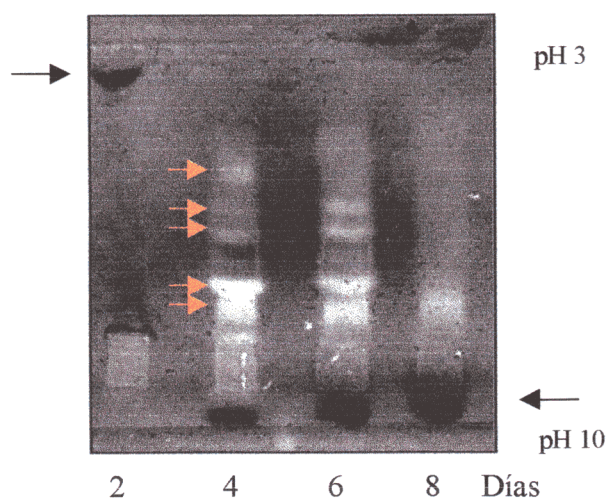


Fig.- 6: IEF analítico del extracto enzimático sobre pectina de manzana. Las flechas naranjas indica las bandas de poligalacturonasas. Las flechas negras corresponden a las esterases.

En la figura 7 podemos ver las isoformas producidas cuando el hongo crece sobre galacturónico, como en el caso anterior se pueden observar varias bandas de poligalacturonasa con pI que oscila entre 4,6 y 9 (pI de 4,6; 5,25; 6,4; 6,8; 7,0; 8,4 y 9,0), es decir un rango más amplio que el detectado sobre pectina. En cuanto a las Pes desaparece la pectinesterasa ácida y se mantiene la básica, con un valor estimado de pI de 9,3, ligeramente más básico que sobre pectina y se detecta solamente a partir del día 6 de cultivo.

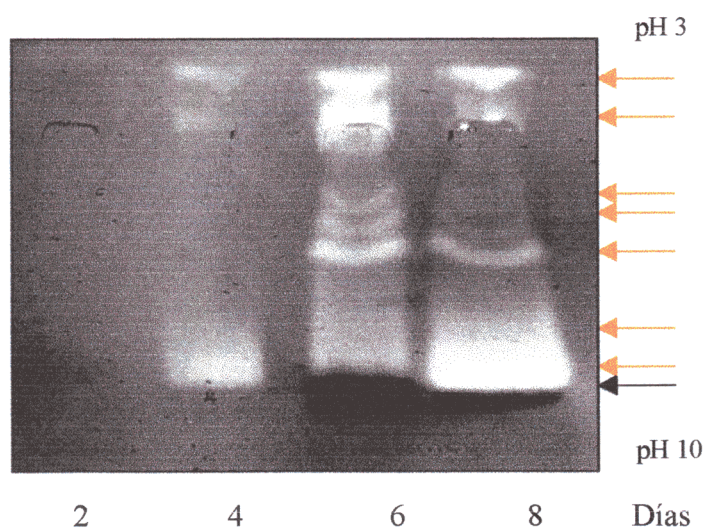


Fig.-7: IEF analítico del extracto enzimático del crecimiento sobre galacturónico. Las flechas naranjas indica las bandas de poligalacturonasas. Las flechas negras corresponden a las esterases

En la figura 8 Se puede observar el patrón isoenzimático sobre ácido poligalacturónico. El patrón de isoformas se modifica considerablemente, la variedad de poligalacturonasas es mucho menor, detectándose sólo dos bandas de poca intensidad con pI de 5,5 y 5,1. En este caso podemos apreciar 2 bandas de esterases con pIs de 8,1 la mayoritaria y 8,7, cuya intensidad va incrementando con el crecimiento.

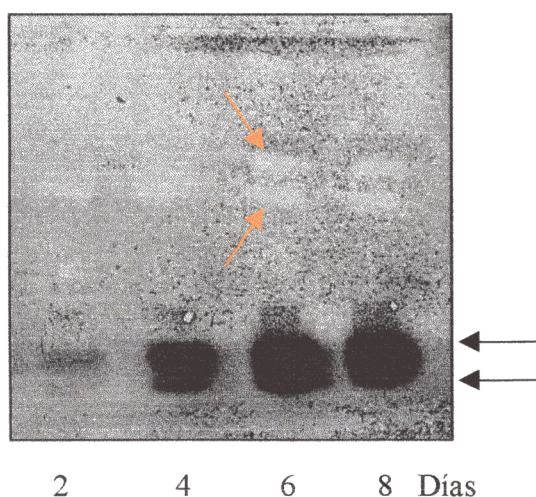


Fig.-8: IEF de los extractos obtenidos cuando el hongo crece sobre poligalacturónico. Las flechas naranjas indican las bandas de poligalacturonasas. Las flechas negras indican las pectinesterasas.

En la figura 9, podemos ver las isoformas cuando el hongo crece sobre extractos paredes de tomate. El patrón isoenzimático es más pobre en el caso de las poligalacturonasas, apreciándose sólo una banda el día 3 de cultivo con un pI de alrededor de 8,0. El resto de los días se aprecian sólo bandas de esterases y en un amplio rango de pH sus pI van desde 5,7 hasta 8,0, es decir el patrón isoenzimático de pectinesterasas es mas rico sobre paredes de tomate.

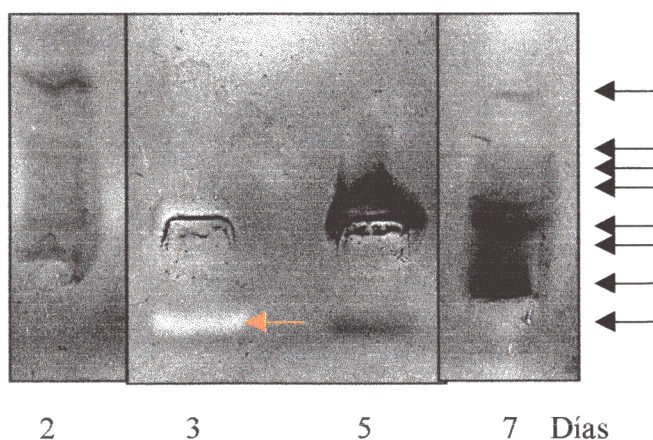


Fig.- 9: IEF de los extractos obtenidos cuando el hongo crece sobre paredes de tomate La flecha naranja indica las bandas de poligalacturonasas. las flechas negras señalan las pectinesterasas

En el isoelectroenfoque realizado, con los extractos sobre glucosa, no detectamos banda alguna lo que nos vuelve a demostrar que las poligalacturonasas producidas por FORL no son constitutivas.

III.3. - CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA.

Un método ampliamente utilizado para conocer el mecanismo de acción de las poligalacturonasas es la identificación de los productos de la degradación del polímero. Para ello realizamos cromatografías en capa fina. Los ensayos se realizaron con extractos obtenidos en todas las fuentes de carbono inductoras, se eligieron dos puntos de la fase de crecimiento (inicio de la fase exponencial y fase estacionaria), los tiempos de reacción fueron, 15 minutos, 30 minutos, 2 horas y 24 horas.

En la figura 10, se muestran los productos de la actividad del extracto cuando el agente inductor era pectina, podemos observar que hay una clara diferencia entre la actividad que se secreta el día 2 y la que se secreta el día 6 de cultivo. El día 2 la actividad es muy lenta, por lo que a tiempos cortos no detectamos apenas productos de reacción, a las 2 horas estos ya son observables y se ve que los productos obtenidos son principalmente dímero, trímero o productos de mayor tamaño. Esto nos indica que la actividad producida el día 2 es mayoritariamente de tipo “endo”. El monómero sólo se aprecia levemente a las 24 horas. La actividad producida el día 6 es claramente de tipo “exo”, ya que desde los primeros momentos de la reacción se detecta solamente el monómero.

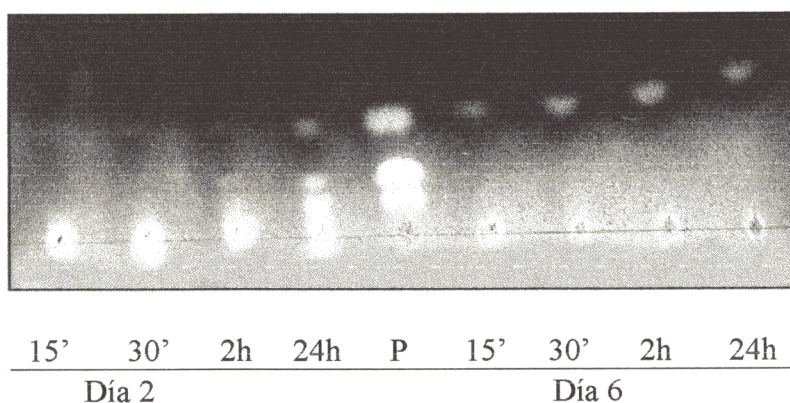


Fig.- 10: cromatografía en capa fina de los extractos del día 2 y 6 de crecimiento sobre pectina. P: monómero, dímero y trímero

En la figura 11, se representa la cromatografía de los extractos del cultivo en galacturónico. El comportamiento de la actividad del día 2 es prácticamente igual al de

la actividad producida el día 2 en pectina, es decir actividad lenta, productos finales se detectan solamente tras tiempos largos de incubación y actividad tipo “endo” mayoritariamente. En cambio el día 6 se observa una mezcla de actividades, las hay tipo “exo” ya que el monómero aparece desde los primeros momentos, pero va acompañado de dímero, trímero y productos de mayor tamaño, lo que nos indica que hay también una actividad tipo “endo”, bastante activa, ya que degrada el sustrato totalmente en tan solo 30’.

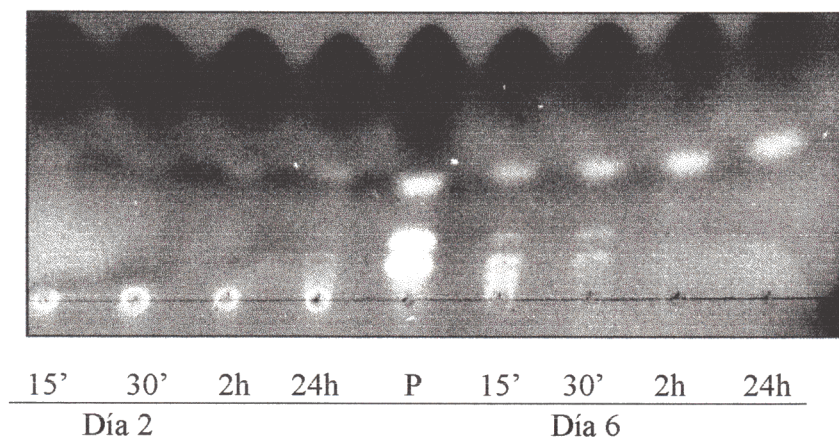


Fig.- 11: Cromatografía de los productos de degradación obtenidos tras la incubación de los extractos sobre galacturónico. P: monómero, dímero y trímero

En la figura 12, podemos observar la cromatoplaqueta correspondiente a los extractos enzimáticos del crecimiento del hongo sobre poligalacturónico. Aunque en ambos casos la actividad producida es claramente de tipo “endo” la acumulación de los productos de degradación es algo diferente. Queremos destacar la acumulación del trímero en los extracto de 6 días de crecimiento.

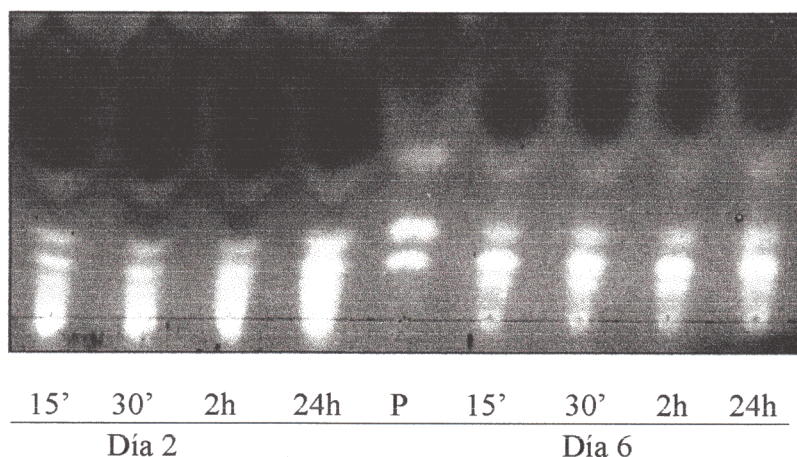


Fig.- 12: Cromatografía de los productos de degradación obtenidos tras la incubación de los extractos sobre poligalacturónico. El carril P son los patrones (monómero, dímero y trímero).

Los resultados de la cromatografía en capa fina correspondientes a los extractos de crecimiento sobre paredes de tomate, se pueden ver en la figura 13. En este caso al

ser el crecimiento más lento, se eligieron los días 3 y 7, para intentar coger los mismos picos de actividad que en los casos anteriores. El comportamiento de los extractos de paredes es similar a lo que ocurre con los extractos de pectina. El día 3 no observamos productos de reacción hasta los 30', que se observan dímero, trímero y productos de mayor tamaño. A las 2h aparece además el monómero, en este caso a las 24 horas sólo aparece el monómero. Esto no indica una mezcla de actividades “endo” y “exo”. El día 7 de cultivo sólo aparece el monómero desde los primeros instantes, lo que nos indica que la actividad es exclusivamente de tipo “exo”.

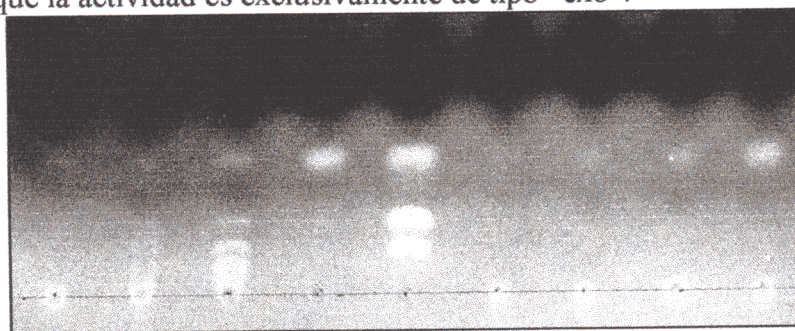


Fig.- 13: Cromatografía de los productos de degradación obtenidos tras la incubación de los extractos sobre paredes de tomate. P: monómero, dímero y trímero

| | | | | | | | | |
|-------|-----|----|-----|---|-------|-----|----|-----|
| 15' | 30' | 2h | 24h | P | 15' | 30' | 2h | 24h |
| Día 3 | | | | | Día 7 | | | |

A la vista de estos resultados decidimos realizar el resto de los estudios con los extractos de crecimiento sobre pectina, ya que obtenemos bastante actividad, son los que más se parecen al crecimiento sobre paredes, la pectina es una fuente de carbono barata, no tiene los problemas de concentración del galacturónico y cuando realizamos los isoelectroenfoco podemos observar una amplia gama de poligalacturonasas.

III.3.1.-DEGRADACIÓN DEL DIGALACTURÓNICO Y EL TRIGALACTURÓNICO POR LAS PGs PRODUCIDAS EL DÍA 2 Y 6 DE CRECIMIENTO SOBRE PECTINA.

Como hemos visto en la figura 10, la actividad producida el día 2 de cultivo cuando el hongo crece sobre pectina, es mayoritariamente tipo “endo”, mientras que la del día 6 es mayoritariamente tipo “exo”. Para comprobar estos resultados y conocer mejor el mecanismo de la degradación, nos basamos en una característica típica de estas

enzimas que es la diferente capacidad de ambos de enzimas para degradar el digalacturónico y trigalacturónico.

En la figura 14 podemos comprobar como la actividad que se produce el día 2 es incapaz de degradar ni el dímero ni el trímero aun en periodos largos de incubación (24h). Esto nos confirma que realmente se trata de una endoPG.

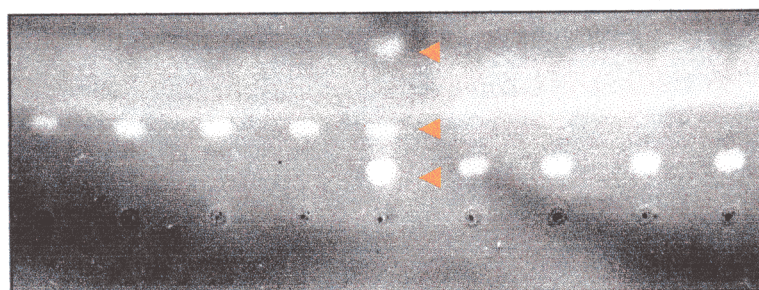


Fig.-14: Degradación del dímero y del trímero por las poligalacturonasas producidas el día 2 de crecimiento sobre pectina. Las flechas indican la posición del monómero, dímero y trímero respectivamente.

30' 2h 5h 24h P 30' 2h 5h 24h
DÍMERO TRÍMERO

Cuando realizamos el mismo experimento con las PGs producidas el día 6 de crecimiento los resultados fueron totalmente distintos. En la figura 15 podemos observar como ya desde los primeros instantes (5 min) el dímero se empieza a degradar a monómero. A partir de 1h de incubación todo el dímero se ha convertido en monómero. Este es un comportamiento típico de la exoPGs de hongos.

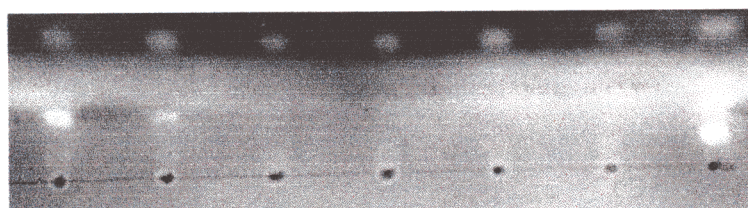


Fig.-15: Degradación del dímero por las PGs producidas el día 6 de crecimiento sobre pectina. Las flechas indican la posición del monómero, dímero y trímero respectivamente.

5' 30' 1h 2h 5h 24h P

En la figura 16 observamos como en el caso de la degradación del trímero por las PGs del día 6 ocurre igual que con el dímero, es decir desde los primeros instantes (5

min) ya se ven los productos de degradación del trímero (dímero y monómero). A partir de la hora de incubación ya solamente podemos apreciar el monómero.

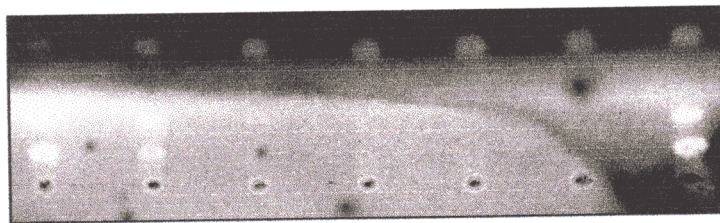


Fig.-16: Degradación del trímero por las PGs producidas el día 6 de crecimiento sobre pectina. Las flechas indican la posición del monómero, dímero y trímero respectivamente.

5' 30' 1h 2h 5h 24h P

III.4.- REPRESIÓN POR GLUCOSA DE LA ACTIVIDAD POLIGALACTURONASA

En el apartado 3.1 hemos podido comprobar como la actividad PG no es constitutiva, es inducible. Queríamos comprobar si además, esta actividad sufría represión catabólica por glucosa, fuente de carbono en la que no se manifestaban ni siquiera niveles basales detectables de PG.

Para ello cultivamos el hongo en presencia de represor (glucosa) más inductor, en nuestro caso pectina de manzana y comprobar si aparecía o no la actividad. Los resultados aparecen en las figuras 17 y 18.

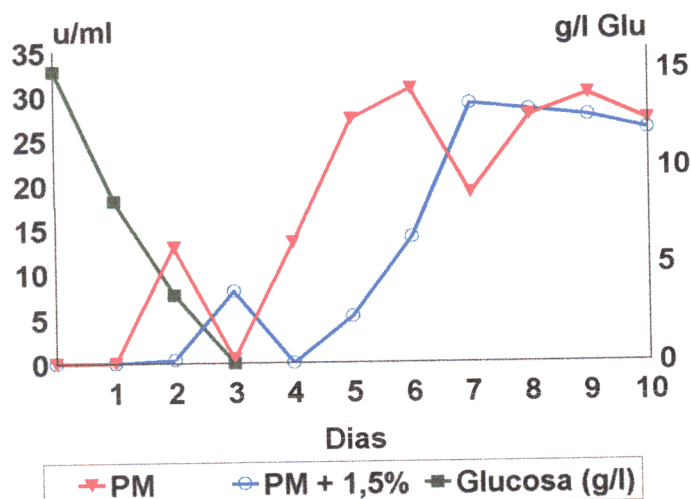


Fig.- 17: Represión por glucosa de la actividad PG. La línea verde muestra la glucosa residual. La línea roja la actividad en cuando el hongo crece sobre pectina de manzana (PM) y la línea azul cuando el hongo crece en pectina de manzana (PM) más glucosa al 1,5%.

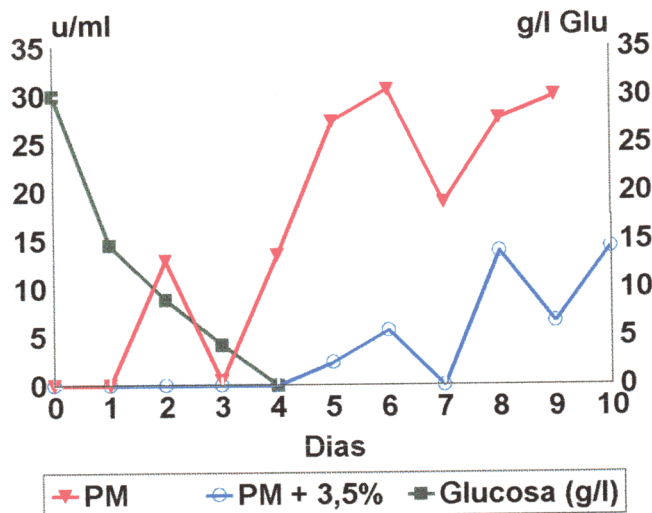


Fig.- 18: Represión por glucosa de la actividad PG. La línea verde muestra la glucosa residual. La línea roja la actividad en cuando el hongo crece sobre pectina de manzana (PM) y la línea azul cuando el hongo crece en pectina (PM) más glucosa al 3,5%.

En la figura 17 y 18 podemos observar como hasta que no se está terminando la glucosa, no empieza a aparecer la actividad. Es decir a pesar de estar presente el inductor, no hay actividad PG hasta que el hongo no ha consumido la glucosa. La actividad consigue recuperarse, apareciendo un primer pico que podría corresponder con la actividad que aparece los primeros días y un segundo pico de actividad máxima, que en el caso del 1,5 % de glucosa casi alcanza el valor máximo de actividad que se obtiene cuando el hongo crece solo sobre pectina y en el caso del 3,5 % de glucosa la actividad máxima sólo llega a alcanzar el 50 % de este valor.

Para confirmar estos datos se realizó otro experimento en el que el hongo crecía sobre pectina, pero el día 1 de crecimiento se le añadía un pulso de glucosa de un 1,5%. Se ve como en la figura 19, en vez de aparecer el primer pico de actividad el día 2, no aparece hasta el día 5 de cultivo. El otro pico de actividad en vez del día 6 aparece el día 9.

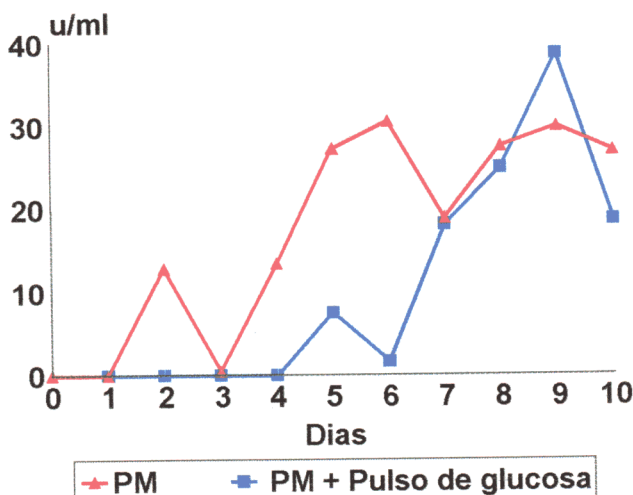


Fig.- 19: Actividad PG a lo largo del crecimiento sobre pectina (PM) (línea roja) y cuando crece sobre pectina (PM) más un pulso de glucosa del 1,5% (línea azul). La flecha verde nos indica el momento en el que hemos añadido el pulso.

III.5.- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXO-PG PREVIA A SU PURIFICACIÓN.

Como hemos dicho anteriormente habíamos elegido los extractos de crecimiento sobre pectina para nuestros estudios, como el día 6 era el día de máxima actividad, se procedió a purificar la actividad mayoritaria de las producidas ese día. Para ello se procedió a la caracterización de la misma antes de su purificación con el fin de conocer características de la enzima que nos pudieran ayudar a planificar un proceso de purificación lo más apropiado posible. Para ello se utilizaron como hemos dicho extractos enzimáticos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* obtenidos tras la filtración del hongo después de 6 días de crecimiento sobre pectina.

III.5.1.- pH óptimo.

Para el estudio del pH óptimo de la actividad PG, se utilizaron soluciones de ácido poligalacturónico al 0,1 % en tampones con diferentes valores de pH, todos ellos a una concentración 50 mM. Se cubrió un rango de pH desde 3,6 a 9,0 con los siguientes tampones: tampón acetato (desde 3,6 hasta 5,6); tampón fosfato (desde 5,6 a 8,0) tampón Tris (desde 8,0 a 9,0).

Los resultados del estudio se muestran en la figura 20. El valor de pH al que se obtuvo mayor actividad PG fue 5,2, conserva un 90% de actividad a pH 5,6, pero la actividad descende drásticamente en valores de pH por encima de 6,0 y por debajo de 4,0.

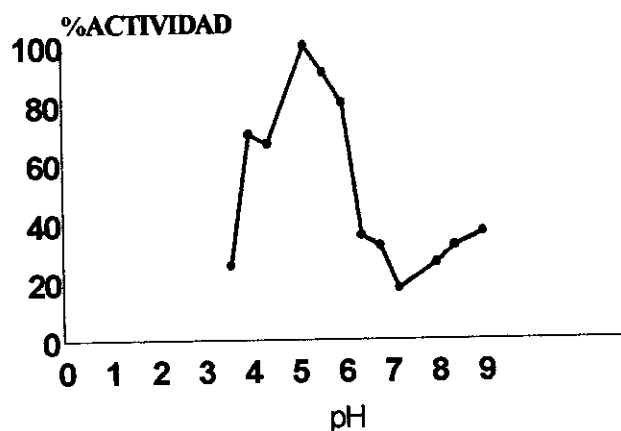


Fig.- 20: pH óptimo de la actividad PG en el extracto enzimático

III.5.2.- Estabilidad al pH

Para determinar la estabilidad al pH la actividad PG se valoró en tampón acetato 50 mM pH 5,2. El valor máximo de estabilidad se observa a pH 5,6. A pH 7,2 se observa una estabilidad del 95%. La enzima se inactiva totalmente a por debajo de 4,0. Queremos destacar la gran pérdida de estabilidad a valores de pH entre 6,0 y 7,0 (Fig. 21).

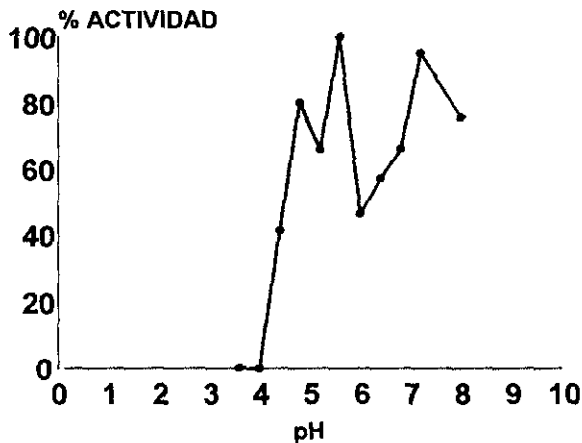


Fig.-21: Estabilidad de la actividad PG del extracto enzimático frente al pH.

III.5.3 .- Temperatura óptima.

Basándonos en los resultados de los apartados anteriores, la actividad se valoró en tampón acetato 50 mM pH 5,2. Se cubrió un rango de temperatura que iba de 10 °C a 70 °C. Pudimos observar como la actividad iba aumentando con la temperatura hasta alcanzar un valor máximo a 60 °C (Fig. 22), a partir de este valor la actividad sufría una caída drástica.

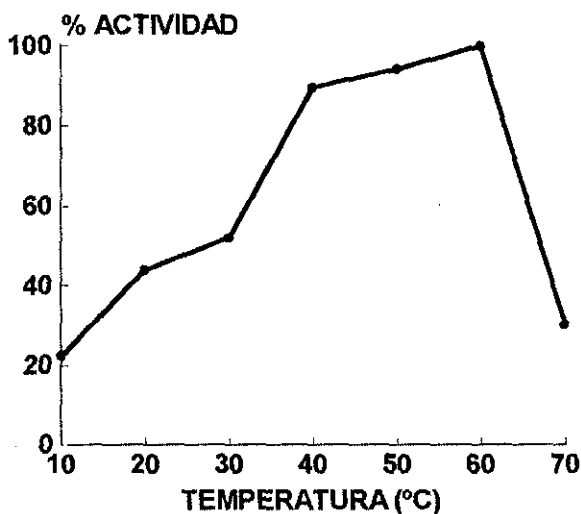


Fig.- 22: Temperatura óptima de la actividad PG del extracto enzimático

III.5.4.- Estabilidad a la temperatura.

En la figura 23 podemos observar como tras la incubación durante 30 minutos del extracto entre 10 y 60 °C no se observa pérdida alguna de actividad. Después de 25 minutos a 65 °C se observa una pérdida del 40 % de la actividad. La enzima se inactivó totalmente tras mantenerla 15 minutos a 70 °C.

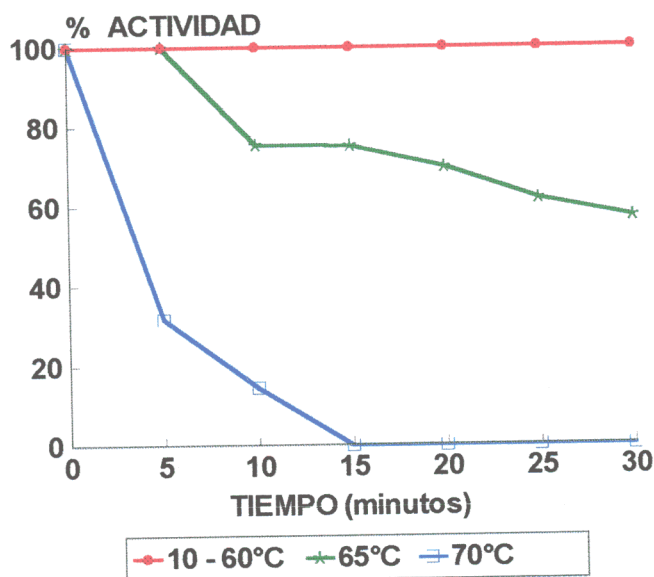


Fig.- 23: Estabilidad de la PG del extracto enzimático a la temperatura

III.5.5.- Afinidad por el ácido poligalacturónico.

La experiencia se realizó a pH 5,2 en tampón acetato 50 mM. En la figura 24 está representada esta relación, que se ajusta perfectamente al modelo cinético de Michaelis-Menten, y la representación doble recíproca de Lineweaver-Burk. Los valores de K_m y $V_{máx}$ fueron de 1,8 mM y $3,46 \times 10^{-2}$ U/mg, respectivamente.

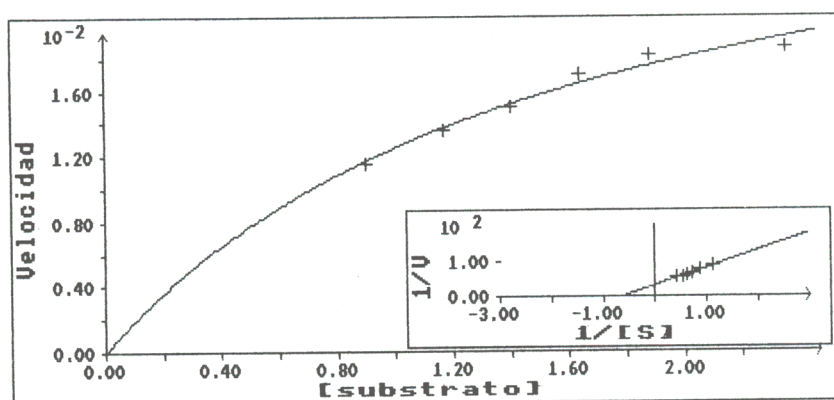


Fig.- 24: Cálculo de K_m y $V_{máx}$ de la actividad poligalacturonasa del extracto enzimático

III.5.6.- Efecto de varios iones y compuestos en la actividad poligalacturonasa.

Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 3.1. Está representado el % de actividad con respecto al control.

| | 5 mM | 2,5 mM | 1 mM | 0,5 mM | 0,25 mM |
|-----------------------------------|------|--------|------|--------|---------|
| NaCl | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| KCl | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| MgSO ₄ | 71% | 80% | 86% | 88% | 97% |
| CoSO ₄ | 0% | 37% | 65% | 81% | 83% |
| CaCl ₂ | 0% | 0% | 83% | 86% | 90% |
| Pb(NO ₃) ₂ | - | - | 40% | 47% | 61% |
| FeCl ₃ | - | - | - | 43% | 51% |
| AgNO ₃ | - | - | - | - | - |
| HgCl ₂ | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| MnSO ₄ | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| CuSO ₄ | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |

| | 20 mM | 10 mM | 5 mM | 1 mM | 0,5 mM |
|------|-------|-------|------|------|--------|
| EDTA | 14,5% | 57% | 128% | 152% | 127% |

Tabla.-3.1: Efecto de varios iones y compuestos sobre la actividad PG.

(- No se puede determinar porque o bien precipita el ion o interfiere con el Somogy)

Los cationes Na⁺ y K⁺ no producen ningún efecto sobre la actividad, a ninguna de las concentraciones ensayadas. La actividad PG no pudo ser medida en presencia de Ag⁺ a ninguna de las concentraciones ensayadas, ya que se producen interferencias con el método de valoración de la actividad, al añadir el reactivo se produce una precipitación y un cambio de color que impide las lecturas colorimétricas. El efecto del catión Fe³⁺ no se pudo medir a concentraciones superiores a 0,5 mM porque el ión precipita; a las concentraciones ensayadas produce inhibición de la actividad. Lo mismo

ocurrió con el Pb^{2+} a concentraciones superiores a 1 mM. El resto de los iones produjeron, en mayor o menor medida, una inhibición de la actividad, destacando el Hg^{2+} , el Cu^{2+} y el Mn^{2+} que producen inhibición total de la actividad, incluso a la menor de las concentraciones ensayadas (0,25 mM). El Ca^{2+} causa inhibición de la actividad a concentraciones superiores a 1 mM. El Mg^{2+} sólo inhibe la actividad un 29 % a la concentración más alta de las ensayadas (5 mM).

La azida sódica (NaN_3) no producía inhibición a ninguna de las concentraciones ensayadas (0,05, 0,25 y 0,5 mM), concentraciones que son superiores a la utilizadas en los tampones para evitar su contaminación.

En el caso del EDTA (etilendiamintetraacetato) se produjo una activación en las concentraciones más bajas de las ensayadas (0,5; 1 y 5 mM), pero a partir de ese punto la actividad comenzó a inhibirse (10 y 20 mM).

III.6.-PURIFICACIÓN DE LA EXOPOLIGALACTURONASA.

III.6.1.- Concentración.

Se partió de caldo de cultivo de *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici* con máxima actividad poligalacturonasa (6 días, con pectina de manzana como fuente de carbono).

Para determinar el método más adecuado para la concentración de la enzima, se comparó el rendimiento (porcentaje de actividad después de la concentración con respecto a la actividad inicial) y el grado de purificación (cociente de la actividad específica después y antes del método de concentración) obtenidos después de la concentración por ultrafiltración (tangencial y no tangencial) y por precipitación de las proteínas por cuatro métodos distintos (ver materiales y métodos apartado 2.4).

Los resultados se pueden observar en la tabla 3.2.

| | Actividad (mU) | Rendimiento (%) | Proteínas (µg) | Actividad Específica | Grado de Purificación |
|--------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| Líquido de cultivo | 17.500 | 100 | 320 | 54 | 1 |
| Etanol 30% | 1.606 | 9,17 | 66 | 24,1 | 0,4 |
| Etanol 60% | 4.452 | 25,4 | 128 | 34,7 | 0,64 |
| Etanol 80% | 0 | 0 | 67 | 0 | 0 |
| Acetona 30% | 400 | 2,3 | 68 | 5,8 | 0,1 |
| Acetona 60% | 3.032 | 17 | 128 | 23,6 | 0,43 |
| Acetona 80% | 1.269 | 7,3 | 310 | 4,1 | 0,07 |
| Ácido tánico | 3.256 | 18,6 | 177 | 18 | 0,3 |
| Filtración no tangencial | 13.523 | 77 | 194 | 69,5 | 1,3 |
| Filtración tangencial | 16.886 | 96,5 | 186 | 90,7 | 1,6 |
| Sulfato amónico 60% | 3.322 | 18 | 142 | 23 | 0,4 |
| Sulfato amónico 75% | 10.160 | 58 | 155 | 65,5 | 1,2 |
| Sulfato amónico 90% | 17.185 | 98 | 272 | 63,2 | 1,17 |

Tabla 3.2: Rendimiento y grado de purificación de la PG obtenidos tras la concentración de las proteínas por diferentes métodos.

En la tabla 3.2 podemos comprobar como los mejores rendimientos se obtienen con la precipitación con sulfato amónico al 90% (98%) y con la ultrafiltración tangencial (96,5%).

La actividad específica más alta se obtuvo cuando utilizamos la filtración tangencial (90,7%). Por tanto el método más rápido y eficaz para concentrar grandes volúmenes es la ultrafiltración tangencial. Cuando se trata de volúmenes pequeños se utilizaron otros métodos como la ultrafiltración no tangencial o las precipitaciones con sulfato amónico.

III.6.2.- Cromatografía de exclusión molecular Bio-Gel P100.

El extracto enzimático concentrado y dializado, se sometió a una cromatografía en una columna de Bio-Gel P100 (Bio-Rad). La cromatografía se realizó al pH y las condiciones que se muestran en el apartado II.6.1.1.

El perfil cromatográfico se muestra en la figura 25. En ella podemos observar que la curva de absorción a 280 nm, parámetro indicativo de la cantidad de proteína, muestra un pico en torno a la fracción 38, que coincide con el pico de actividad poligalacturonasa.

Las fracciones con actividad se juntaron y en este paso se obtuvo un rendimiento del 62,3 % y un factor de purificación del 18,01 % (Tabla 3.2).

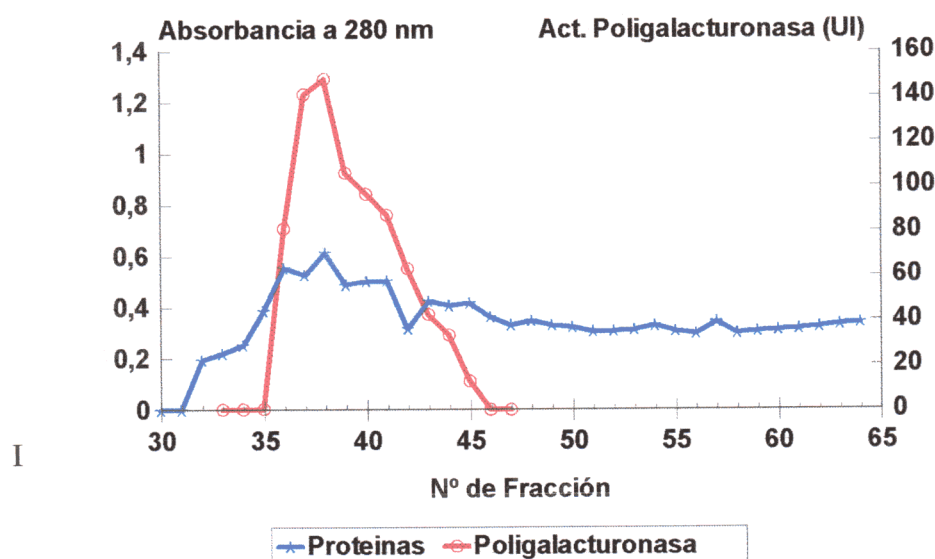


Fig.- 25: Perfil cromatográfico del crudo enzimático aplicado a una columna de Bio-Gel P100.

II.6.3.- Cromatografía en Mono-Q.

El pI es una característica propia de cada enzima, por esta razón decidimos utilizar una columna de intercambio iónico de alta eficacia, en el siguiente paso de purificación. En la preparación de la muestra las fracciones con actividad PG procedente de la cromatografía en Bio-Gel P100 se concentraron hasta aproximadamente 1 ml por filtración no tangencial y se dializaron.

En el perfil cromatográfico obtenido a 280 nm (Fig. 26) se observa un pico mayoritario de proteína bastante simétrico, con un tiempo de retención de 12,2 minutos, que coincide con la actividad poligalacturonasa. En los dos siguientes picos, con tiempos de retención de 13,62 y 14,76 también se encontró actividad PG. Estos picos se denominaron PG₁, PG₂ y PG₃ respectivamente.

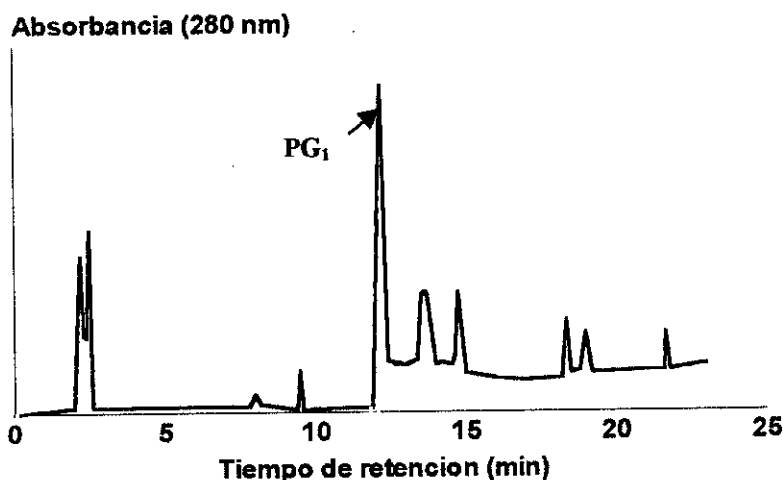


Fig.-26: Perfil cromatográfico obtenido tras aplicar la muestra a una columna Mono-Q

III.6.4.- Resultado global del proceso de purificación.

El resultado global del proceso de purificación se muestra en la tabla 3.3., obteniéndose para la PG₁ un rendimiento global de 8,6 % y un factor de purificación de 32,58.

| Etapa | | Proteínas (mg) | Actividad (UAE) | A. específica (UAE/mg) | Purificación | Rendimiento % |
|--------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|---------------------------|--------------|------------------|
| Extracto crudo | | 143,9 | 1757,79 | 12,21 | 1,0 | 100 |
| Concentración y Diálisis | | 34,90 | 1406,23 | 40,29 | 3,3 | 80 |
| Bio-Gel P100 | | 7,1 | 1091,7 | 153,1 | 12,54 | 62,11 |
| Mono-Q | PG ₁ | 0,38 | 151,17 | 397,81 | 32,58 | 8,6 |
| | PG ₂ | 0,61 | 113,56 | 186,16 | 19,26 | 8,1 |
| | PG ₃ | 0,74 | 119,39 | 161,33 | 13,40 | 6,8 |

Tabla.- 3.3: Proceso de purificación de la PG

III.7.- CARACTERIZACIÓN DE LA PG₁

Todos los ensayos realizados a continuación se llevaron a cabo con la PG₁ ya que esta fue la enzima mayoritaria del complejo producido por FORL el día 6 de crecimiento sobre pectina.

III.7.1.- Modo de acción.

El modo de acción de la enzima purificada se estudió por cromatografía en capa fina. Analizamos los productos de la reacción enzimática tras 5 minutos, 30 minutos 2 horas y 24 horas. Los resultados obtenidos se aprecian en la figura 27.

Desde el primer momento de la reacción, hasta las 24 horas, sólo se aprecia liberación de ácido monogalacturónico, lo que sugiere un modo de acción claramente terminal, es decir la enzima es una exoPG.

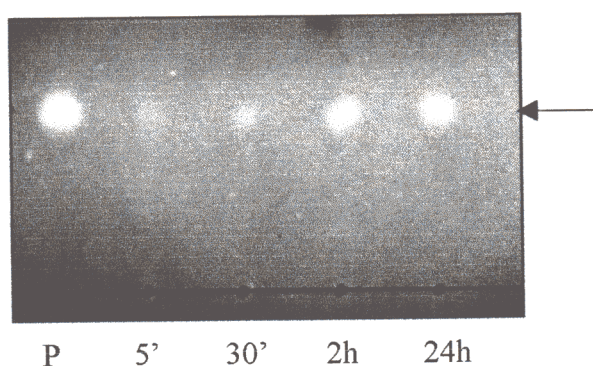


Fig.-27: Modo de acción de la PG₁ a diferentes tiempos. P: monogalacturónico.

III.7.2.- Masa molecular.

La determinación de la masa molecular de la enzima se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida condiciones desnaturalizantes, tratando la muestra con SDS.

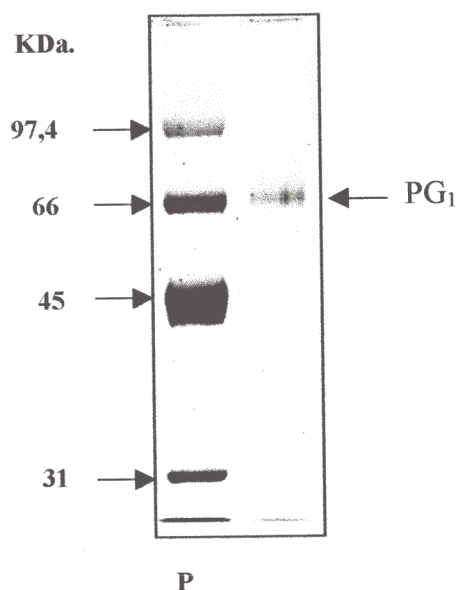


Fig.- 28: SDS-PAGE de la proteína purificada. P: patrones de masa molecular.

El Rf estimado fue 4,3 cm. Mediante la recta de regresión, obtenida a partir de proteínas de masa molecular conocida, se calculó una masa molecular aproximado de 68000 Da. (Fig. 28).

III.7.3.- Punto isoelectrico.

La determinación del punto isoelectrico de la PG₁ se llevó a cabo mediante IEF, como se describe en el apartado II.7.2 de materiales y métodos. El punto isoelectrico de la enzima estaba en torno a 6,6. (Fig.29)

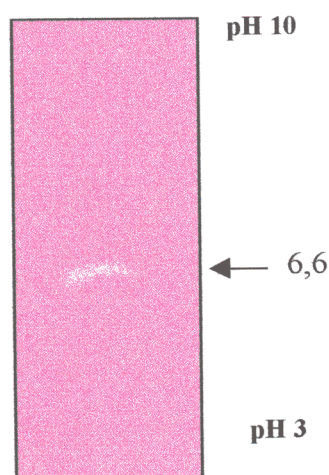


Fig.- 29: IEF de la PG₁ teñido con rojo de rutenio

III.7.4. pH óptimo.

Se llevó a cabo de la misma manera que con el extracto enzimático. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30.

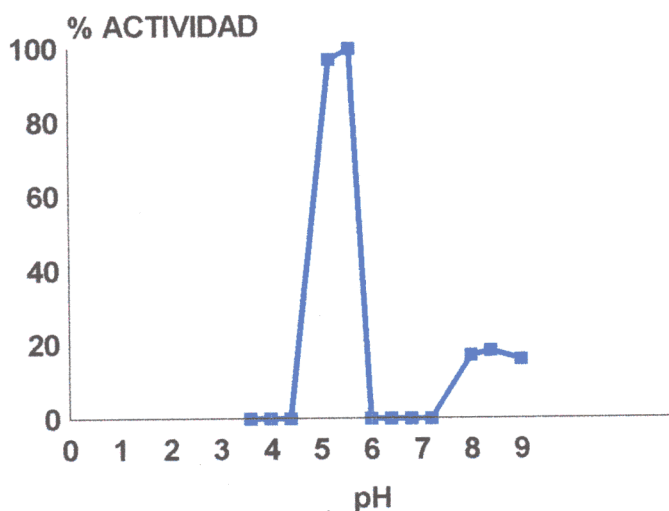


Fig.- 30: pH óptimo de la exo-PG₁

Como se puede apreciar en la figura 30, el pH óptimo de la enzima se encuentra en torno a 5,6. Su actividad era inapreciable en valores de pH inferiores a 4,5 y entre pH 6,0 y 7,2. La actividad se recupera, en parte, a partir de este valor.

III.7.4.- Estabilidad frente al pH.

Para valorar la estabilidad frente al pH de la enzima purificada se procedió de igual manera que con el extracto. La enzima, como podemos observar en la figura 31, presenta su máxima estabilidad a pH 5,6, inactivándose totalmente a valores inferiores a 4,0 y entre pH 6,0 y 6,8.

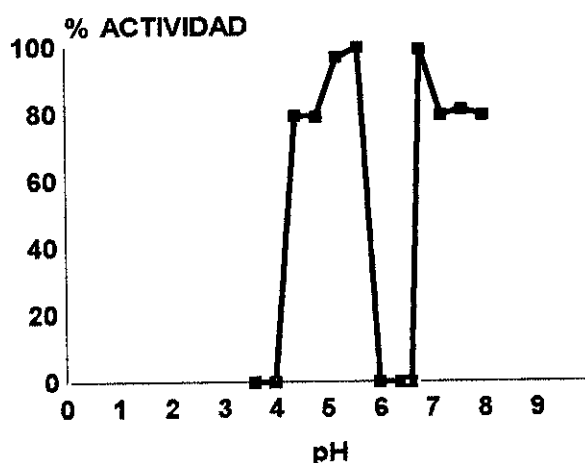


Fig.- 31.- Estabilidad frente al pH de la PG₁.

III.7.5.- Temperatura óptima de la PG₁.

Los resultados se muestran en la figura 32:

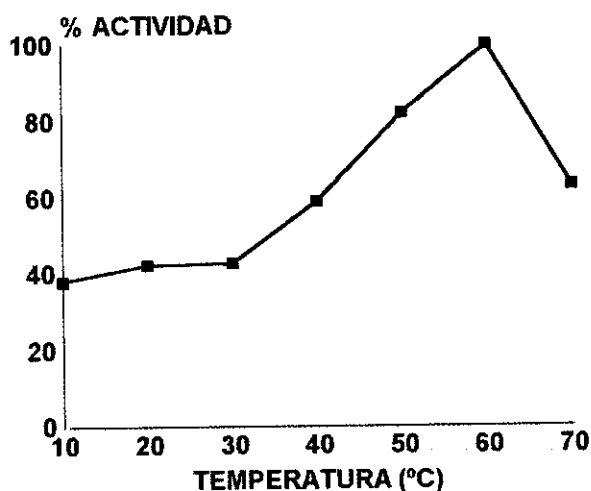


Fig.-32: Temperatura óptima de la PG₁.

Los resultados fueron muy parecidos a los obtenidos con el crudo enzimático, es decir la actividad fue aumentando desde los 10 °C hasta los 60 °C, situándose en este punto su valor máximo de actividad. A partir de esta temperatura la actividad desciende.

III.7.6.- Estabilidad frente a la temperatura.

La enzima purificada se muestra un poco más sensible frente a la temperatura, que el extracto enzimático. Sin embargo los resultados son bastante similares. La estabilidad es máxima hasta los 50°C, descendiendo un 10% su actividad tras 20 minutos a 60 °C. La inactivación de la enzima es total después de 15 minutos a 65 °C o 5 minutos a 70 °C. Los resultados se pueden observar en la figura 33.

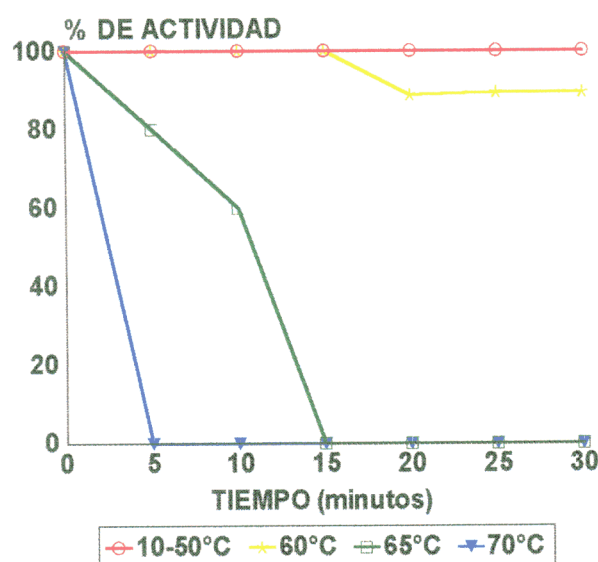


Fig.- 33: Estabilidad frente a la temperatura de la PG₁.

III.7.7.- Afinidad por distintos sustratos de la exoPG.

Los ensayos se realizaron a 37 °C utilizando tampón acetato pH 5,2 50 mM.

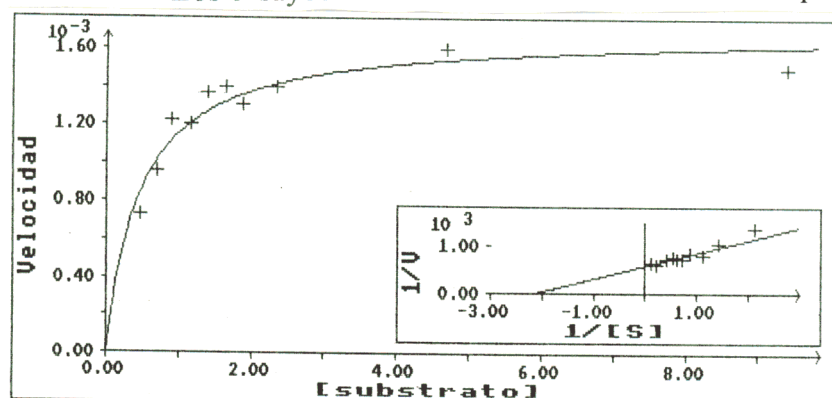


Fig.-34: Representación de la K_m y V_{max} de la enzima purificada, utilizando como sustrato el ácido poligalacturónico.

En la figura 34 podemos observar como cuando utilizamos poligalacturónico como sustrato la relación se ajusta al modelo de Michaelis-Menten. De la representación de Lineweaver-Burk se obtienen unos valores de K_m de $6,44 \times 10^{-1}$ mM y de V_{max} de $1,8413 \times 10^{-3}$ U/mg.

En la figura 35 se puede ver como cuando utilizamos digalacturónico como sustrato, también se consigue el ajuste al modelo de Michaelis-Menten. Como en el caso anterior, de la representación de Lineweaver-Burk se obtienen unos valores de K_m de 1,17 y de V_{max} de $2,06 \times 10^{-3}$ U/mg.

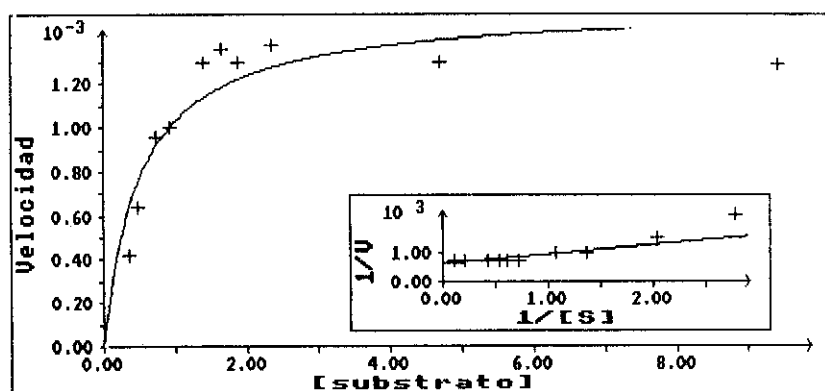


Fig.-35: Representación de K_m y V_{max} de la enzima purificada, utilizando como sustrato el digalacturónico.

El último sustrato que probamos fue el trigalacturónico, los ensayos se realizaron con estos tres sustratos porque son esenciales para comprobar que realmente se trata de una actividad tipo "exo". Cuando realizamos los ensayos con el trimero comprobamos como se ajusta también a de Michaelis-Menten. De la representación de Lineweaver-Burk se obtienen unos valores de K_m de 0,99 y de V_{max} de $1,9 \times 10^{-3}$ U/mg

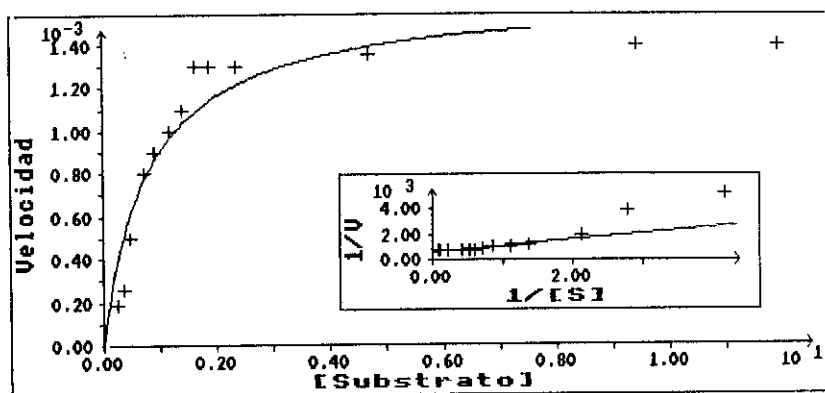


Fig.-36: Representación de K_m y V_{max} de la enzima purificada, utilizando como sustrato el trigalacturónico.

III.7.8.- Naturaleza glicoproteica de la proteína.

La naturaleza glicoproteica de la proteína se determinó mediante el método descrito en el apartado II.7.2. de materiales y métodos. Tras resuspender las muestras en tampón adecuado se aplicaron en una membrana de nitrocelulosa. Las concentraciones de proteína aplicadas fueron, 0,5 μ g, 1 μ g y 5 μ g. Como control positivo se utilizó 1 μ g de una proteína glicosilada (ole1). Tras la incubación y el revelado se comprobó como, en todas las concentraciones ensayadas, el resultado era positivo, es decir la enzima era una glicoproteína (Fig. 37).

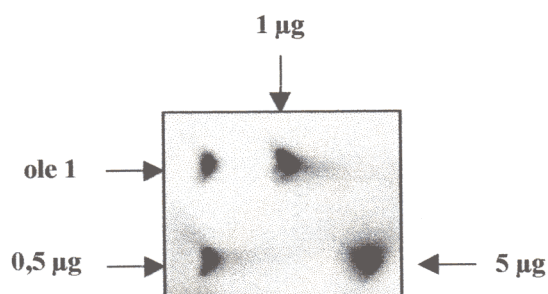


Fig.- 37: Detección de glicoproteínas. Las flechas indican las distintas concentraciones de PG₁. Ole 1 (1 μ g), es un control positivo.

III.7.9.- Contenido en carbohidratos.

Una vez conocido que nuestra enzima era una glicoproteína procedimos a intentar averiguar el porcentaje de azúcares que tenía la proteína. Se realizó mediante el método de Trevelyan y Harrison (1952), este método se basa en la reacción de la antrona con la proteína, ésta libera los carbohidratos de la proteína inespecíficamente, es decir sin tener en cuenta si las uniones son de tipo O o N-glicosídicas. Se estimó que el contenido total de carbohidratos de la proteína era de aproximadamente un 29 %.

III.3.10.- Desglicosilación de la proteína.

El objeto de tratar la PG₁ con endo- β -N-acetil glucosaminidasa H (endo-H) es liberar los oligosacáridos unidos por enlaces N-glicosídicos, al hidrolizarse el enlace

entre los dos restos de N-acetil-glucosamina que unen el oligosacárido a la asparagina de la proteína.

En la figura 38 podemos comprobar como tras la desglicosilación con endo-H, la masa molecular de la proteína desciende considerablemente, pasando a ser aproximadamente unos 50 kDa..

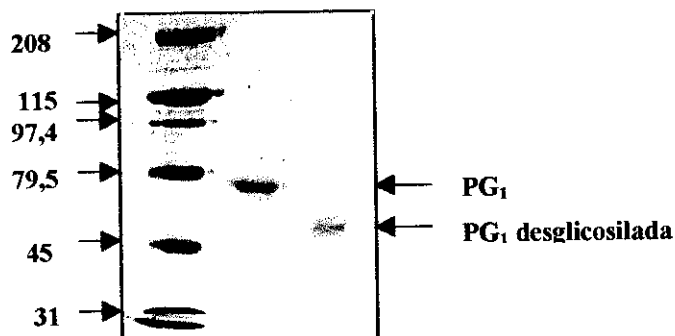


Fig.- 38: Desglicosilación de la PG₁

Si tenemos en cuenta que el porcentaje de azúcar estimado para la proteína mediante desglicosilación con endo-H es prácticamente igual al obtenido por mediante la reacción con la antrona y que los intentos de desglicosilar la proteína con enzima que rompen los enlaces O-glicosídicos han resultado infructuosos, podemos deducir que está enzima además de estar fuertemente glicosilada, todos sus azúcares están unidos a la proteína mediante uniones N-glicosídicas.

III.7.11.-Secuencia del amino terminal y de un péptido interno de la proteína

La secuencia del extremo amino terminal se determinó utilizando PG₁ purificada mediante DEAE y electroelución. Para poder secuenciar el extremo amino, la enzima se tuvo que desnaturalizar y desglicosilar. Tras este proceso la secuencia obtenida fue:

X-X-Arg-Lys-Val-Tyr-Thr-Ile-Arg-His-Ser-Lys-Asn-Asp-Asn-Asp-X-Val-Ser-Ser

Para conseguir el péptido interno la PG₁ desnaturalizada y desglicosilada se hidrolizó con tripsina. Los péptidos así obtenidos se separaron mediante una columna C₁₈. De todos los picos 6 picos mayoritarios obtenidos se eligió el más simétrico, con

mayor absorbancia a 254 nm, descartando los que salían al principio o al final de la elución de la columna. La secuencia de este péptido interno fue:

Ala-Trp-Val-Asp-Ile-Gly-Asp-Asp-X-Phe-Ser-Pro-Pro

III.7.12.- Composición de aminoácidos.

En la tabla 3.4 podemos observar la composición de aminoácidos de la PG₁. El número de residuos/molécula se ha obtenido teniendo en cuenta la masa molecular de la proteína desglucosilada.

| Aminoácido | Nº residuos/molécula |
|------------|----------------------|
| As- (D)(N) | 57 |
| Thr (T) | 34 |
| Ser (S) | 42 |
| Gl- (E)(Q) | 46 |
| Gly (G) | 96 |
| Ala (A) | 44 |
| Cys (C) | 2 |
| Val (V) | 27 |
| Met (M) | 4 |
| Ile (I) | 21 |
| Leu (L) | 29 |
| Tyr (Y) | 4 |
| Phe (F) | 21 |
| His (H) | 9 |
| Lys (K) | 33 |
| Arg (R) | 13 |
| Pro (P) | 22 |

Tabla.- 3.4: Composición de aminoácidos de la PG₁. Están expresados en residuos por molécula.

III.8.-OBTENCIÓN DE UNA Sonda PARA LA EXO-PG.

La amplificación de DNA de FORL, usando como cebadores unos oligonucleótidos degenerados obtenidos a partir de las secuencias del N-terminal y del péptido interno de la proteína, dio un único fragmento de 753 pb. Después de clonar este fragmento y secuenciarlo se comprobó, con los bancos que utiliza el programa

BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), que presentaba similitud de secuencia con las únicas secuencias de exoPGs de hongos publicadas, por lo que se concluyó que se trataba efectivamente de un fragmento codificador de una exoPG. La secuencia aparece en la figura 39. Gracias a los datos de transcripción inversa obtenidos por Posada (Congreso Nacional de Fitopatología, 1998), se han podido localizar los 3 intrones (que aparecen en minúscula) y se ha podido deducir la secuencia de aminoácidos. También se han localizado los posibles sitios de glicosilación (aparecen subrayados).

```

AAGGTCTACACTATCAGACATAGTAAGAACGACAACGATGATGTCTCGTCAGAG      54
K V Y T I R H S K N D N D D V S S E      18

TTCTATAAGGGCTTGAAGAAGGCGAACAAGGGAGGTACTCTGTACCTCCCCAAG      108
F Y K G L K K A N K G G T L Y L P K      36

GGTCAGACTTTTGTTCATTGGAAAGCCCCTTGATCTCACCTTTTTGAATGATATT      162
G Q T F V I G K P L D L T F L N D I      54

CATGTTTCATCTTGAGGGTGAGATTAAGTTTACCAATGATACGGAGTATTGGCAG      216
H V H L E G E I K F T N D T E Y W Q      72

AAGAATGTTTATAAGCATCCTTTCCAGgtatgtcactgaaaccttcatgatgag      270
K N V Y K H P F Q      intron I      81

ttgagactaatggttgttagAACTCGATCATGTTCTGGAAGTGGGGTGGCAAGAA      324
      N S I M F W K W G G K N      93

CATCAAGCTTTACGGAAAGGGTGTTCCTGAACGGTAACGGTCAGCGATGGTGGAA      378
I K L Y G K G V L N G N G Q R W W N      111

CGgtatgacccctcttatcatattttaggtcatattctaacaatatgcagAGTT      432
E      intron II      F      113

TGCCGGCAAGGAGATTCTTGACACTACCAACGCCTACCTCCGACCTATTCTGTT      486
A G K E I L D T T N A Y L R P I L F      131

CTATGCTCAGAACGCCACCAACCTGGACATCCAGGGAGTTCACTTCAAGGACTC      540
Y A Q N A T N L D I Q G V H F K D S      149

CCCCTGCTGGACCAATTTTGTCTGTCACCTgtaaggaaccctagccaagtcctga      594
P C W T N F V V T S      intron III      159

tgatcatgtactgatattcttcttagCCAAGGACATCTCGTTCAAGGACGTCATC      648
      K D I S F K D V I      168

TGCACTGCTCGCTCCACCAACGCCACTGCTCTTCCCAAGAACACTGACTTCTTT      702
C T A R S T N A T A L P K N T D F F      186

```

| | |
|---|-----|
| GACTCCCTGAACGTTGAGAACCTCAATGTTGAGCGTGCCTGGGTCGATATC | 753 |
| D S L N V E N L N V E R A W V D I | 203 |

Fig.- 39: Secuencia de nucleótidos del fragmento obtenido por amplificación de DNA genómico de FORL. La secuencia de aminoácidos obtenida aparece debajo. Los intrones están en letra minúscula. Los posibles sitios de glicosilación están subrayados.

III.9.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA PG₁

Los anticuerpos policlones frente a la exoPG, purificada por electroelución, fueron obtenidos como se indica en el apartado II.13 de materiales y métodos. La titulación de los sueros obtenidos se determinó mediante la técnica de “Dot-blot” utilizando distintas diluciones de suero con el anticuerpo frente a la exoPG (1:250; 1:500, 1:1000, 1:5000 y 1:10000) y distintas concentraciones de enzima purificada (1,5 ng, 1,0 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,10 ng, 0,05 ng y 0,02 ng). De los resultados obtenidos seleccionamos la dilución de suero 1:10000 ya que era suficiente para detectar la banda de poligalacturonasa con nitidez. En cuanto a la concentración de proteína, los resultados del “Dot-blot” se muestran en la figura 40.

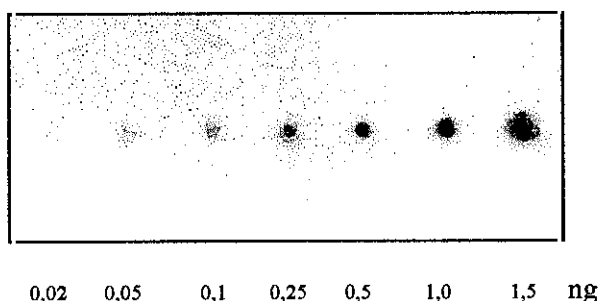


Fig.- 40: Dot-Blot con distintas concentraciones de proteína purificada.

Los anticuerpos constituyeron una buena herramienta y con ellos realizamos varios experimentos, unos encaminados a detectar la enzima en los extractos de cultivo con las distintas fuentes de carbono y otros a detectar la presencia de la enzima en raíces de planta infectada y ver su evolución a lo largo de la infección.

III.9.1. Detección de la enzima en extractos procedentes del crecimiento en distintas fuentes de carbono.

Para realizar estos experimentos, primero hicimos una electroforesis, en condiciones desnaturalizantes, con los extractos obtenidos tras el crecimiento en las distintas fuentes de carbono, para así ver el patrón de bandas obtenido en cada caso. Los resultados se muestran en la figura 41

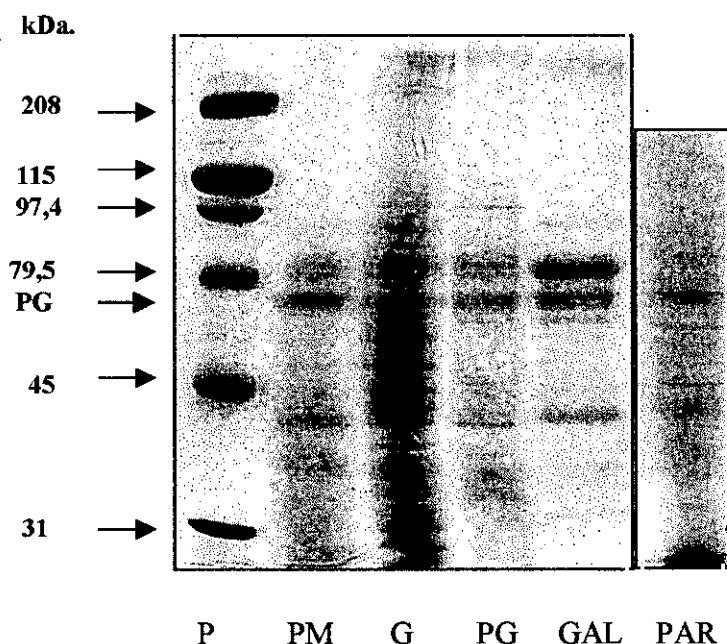


Fig.-41.- SDS-PAGE con 50 μ g de los extractos obtenidos tras el crecimiento en distintas fuentes de carbono: PM (pectina de manzana), G (glucosa), PG (poligalacturónico), GAL (galacturónico) PAR (paredes). El carril P son los patrones. La flecha azul indica la posición aproximada de la exoPG.

Podemos ver como aparentemente existe una banda proteica con una movilidad similar a la de la exoPG que se aprecia con mas intensidad en el caso de los extractos de pectina y ácido galacturónico. En el caso de la glucosa se aprecia el patrón proteico más complejo.

Mediante “immunoblotting” de los extractos obtenidos con fuentes de carbono inductora y no inductoras (30 ng de proteína total), sólo detectamos una señal específica en los extractos obtenidos sobre pectina (Fig. 42). En el resto de los casos (galacturónico, paredes de tomate y poligalacturónico) sólo se puede detectar la banda si cargamos el gel con 1 μ g de proteína total, con lo que aumentan las señales

inespecíficas, es decir no aparece sólo la banda correspondiente a la PG sino también otras bandas que nos hacen pensar en una reacción inespecífica.

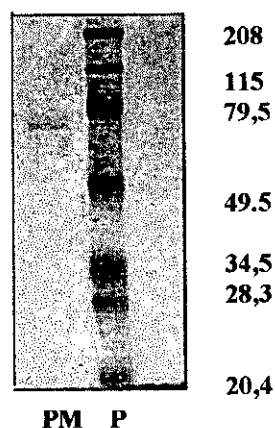


Fig.- 42.- Inmunoblot de los extractos de crecimiento en pectina. La P indica el carril de los patrones de masa Molecular.

III.9.2.- Inmunodetección de la exoPG en planta infectada.

Se hicieron dos tipos ensayos con raíces infectadas y raíces control. En los primeros ensayos se procedió a la extracción de las proteínas totales de la raíz control e infectada y se realizó con ellas un “Western-Blot”. El segundo grupo de ensayos se realizó mediante el contacto directo de las raíces infectadas y control con una membrana de transferencia (DT-IBA). En ambos casos el revelado fue mediante anticuerpos. Las raíces y los extractos proteicos de las mismas fueron suministrados por la Dra. Teresa Rodríguez del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología (UCM).

Los primeros ensayos se realizaron mediante “Western-blot” con 120 ng de proteína total por carril. Las proteínas fueron extraídas de raíz y cuello de planta de doce días tanto sin infectar como infectada con FORL. Tras el revelado con los anticuerpos se puso de manifiesto la existencia de una banda de movilidad electroforética similar a la exoPG purificada de FORL, que solamente aparecía en los extractos proteicos correspondientes a la raíz de planta infectada. En el carril de la raíz control no se apreciaba banda alguna. Estos datos nos confirman la expresión *in planta* de la exoPG de FORL. Los resultados del “inmunoblot” se muestran en la figura 43.

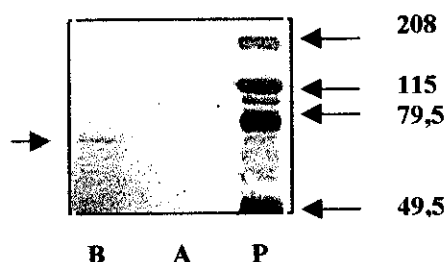


Fig.- 43: Inmuno-Blot realizado con planta control (carril A) y planta infectada con FORL (carril B). El carril P corresponde a los patrones de masa molecular. la flecha azul indica la banda de PG.

La preparación de los extractos proteicos de plantas es una tarea tediosa por lo que procedimos a utilizar la técnica DT-IBA que es mucho más rápida y directa y nos conduce a resultados similares.

Dentro de estos experimentos se realizaron unos con raíz infectada por FORL y una raíz control ambas de 28 días, se eligió este día por ser en el que presentaba síntomas más patentes. Realizamos un corte en la zona de la raíz próxima al cuello y se puso el disco así obtenido en contacto directo con la membraba de transferencia. Tras revelarlo con los anticuerpos contra la exoPG podemos observar como la señal de la raíz infectada es muy superior a la de la raíz control (siempre se espera alguna señal en el control debido a la homología de las exoPG de planta y hongo) (Fig. 44)

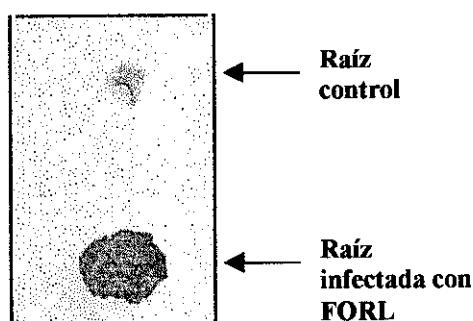


Fig.- 44: DT-IBA realizado con raíz control y raíz infectada de 28 días.

También se realizaron experimentos con raíces de planta infectada y recogida en tres momentos diferentes en cuanto al desarrollo de los síntomas de la enfermedad. los resultados se muestran en la figura 45. Podemos observar como la señal va aumentando conforme aumenta la edad de la planta. Los síntomas externos de la infección también se van haciendo más patentes conforme aumenta la edad de la planta. El día 14

empiezan a aparecer los primeros síntomas y el día 28 la raíz está prácticamente necrosada.



Fig.- 45: DT-IBA de raíces infectadas por FORL de diferentes edades (14, 21 y 28 días)

III.10.- ENSAYOS CON PGIPs: PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA POLIGALACTURONASA.

Las PGIP son una familia de proteínas especializadas en el reconocimiento e inhibición de las endopoligalacturonasas. Hasta ahora sólo se ha descrito que estas enzimas son capaces de inhibir a endoPG fúngicas y no de otro origen.

Nuestros ensayos fueron realizados con la exoPG purificada y dos proteínas inhibidoras, la PGIP I es una proteína inhibidora aislada de *Phaseolus vulgaris* que es capaz de unirse a endoPG purificada de *Aspergillus niger*, pero no a la endoPG purificada de *Fusarium moniliforme*; La PGIP II, está también fue también purificada a partir de extractos *Phaseolus vulgaris* y esta sí es capaz de interaccionar con la endoPG de *Fusarium moniliforme*. Todos los inhibidores fueron purificados y cedidos por el Dr. Felice Cervone de la Universidad "la Sapienza", en Roma.

Se comprobó el tanto por ciento de inhibición que sufría la exoPG con diferentes concentraciones de inhibidor. Los ensayos se realizaron usando como sustrato el ácido poligalacturónico al 0,1% en tampón acetato 50 mM pH 5,2, es decir las mismas condiciones que cualquier otro ensayo de actividad. La temperatura de incubación fue 37 °C.

En la figura 46 podemos observar como con la PGIP I se produce inhibición de la exoPG. El 100 % de inhibición se alcanza con 1 µg de proteína inhibidora y son suficientes 300 ng de proteína para producir un 90 % de inhibición.

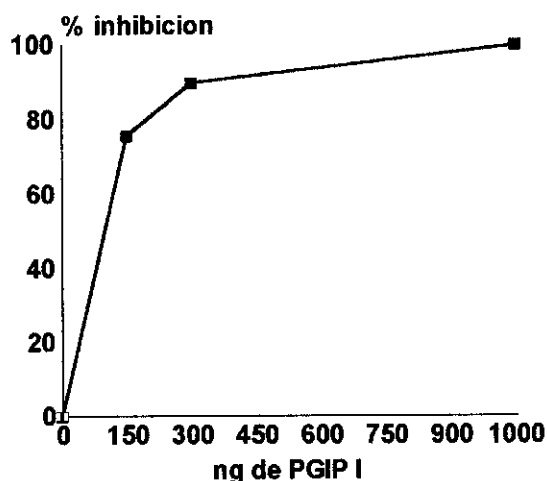


Fig.- 46: Efecto inhibitorio producido por la PGIP I sobre la exoPG.

Cuando ensayamos el efecto del PGIP II observamos que esta proteína también consigue inhibir a la exoPG, en este caso el 90 % de inhibición se consigue con 100 ng de proteína y el 100% de inhibición con 400 ng de la misma (Fig. 47), es decir este inhibidor actúa más eficazmente sobre la exoPG.

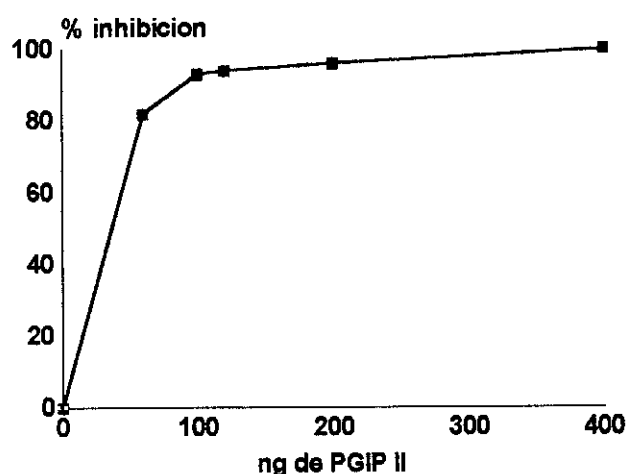


Fig.- 47: Efecto inhibitorio producido por la PGIP II sobre la exoPG.

Con estos resultados podemos decir que los dos inhibidores producidos por la misma planta, actúan de distinta manera frente a la exoPG, ambos son capaces de inhibirla aunque con distinta eficacia.

DISCUSIÓN

Con la llegada del cultivo intensivo de tomate en invernadero, el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* Jarvis y Shoemaker (FORL) (Jarvis y Shoemaker, 1978) se convirtió en un serio problema. Los aislamientos de FORL producen daños en variedades con genes de resistencia frente a las razas 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hans (FOL) que causa la podredumbre vascular del tomate. Aunque la resistencia a FORL se ha incorporado a algunos cultivares comerciales, la enfermedad sigue siendo un serio problema en amplias zonas del hemisferio Norte (Beckman, 1987; Brammall y Higgins, 1988 a; Katan *et al* 1991; Kuninaga y Yokosawa, 1991; Tello y Lacasa, 1988).

Se han realizado numerosos estudios ultraestructurales (Brammall y Higgins, 1988 a, 1988 b; Charest *et al.*, 1984), a veces completados con técnicas citoquímicas (Benhamou *et al.*, 1988, 1989 b, 1990 a, 1990 b, 1990 c, 1991; Chamberland, *et al.*, 1985, 1989) en los que se describe el mecanismo de penetración del hongo a través de los tejidos de la raíz infectada. La colonización del hongo por FORL está asociada con modificaciones en las paredes de las células del hospedador incluyendo la interrupción o incluso la pérdida de las matrices de la lámina media. Todo esto implica la producción, por parte del hongo, de enzimas “degradadoras de la pared celular” (Brammall y Higgins, 1988 a; Charest *et al.*, 1984). También se han localizado en los tejidos de las raíces infectadas por FORL, los productos de la degradación de enzimas pécticas y los estudios ultraestructurales llevados a cabo sugieren que FORL causa una degradación localizada de la pared celular (Benhamou, 1990 a).

IV.1.- DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES IDÓNEAS PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO Y LA PRODUCCIÓN DE POLIGALACTURONASAS.

Entre todas las enzimas pécticas que están implicadas en la degradación de la pared celular, nosotros nos hemos centrado en la poligalacturonasas (PG). Según varios autores estas enzimas son las primeras que actúan sobre el sustrato (Karr y Albersheim, 1970), y son las primeras secretadas por los patógenos cuando estos crecen sobre paredes vegetales (Jones *et al.*, 1972). Estas enzimas, asimismo, están implicadas en la

inducción de los mecanismos de defensa en las plantas (Benhamou *et al.*, 1990 a; Cervone *et al.*, 1987).

Las enzimas pécticas suelen ser inducibles por sustratos pécticos como la pectina, el ácido poligalacturónico, el ácido galacturónico o paredes vegetales (García-Maceira *et al.*, 1997; Fraissinet-Tachet y Fevre, 1996; Blanco *et al.*, 1994; Riou *et al.*, 1992; Siéssere *et al.*, 1992; Polizeli *et al.*, 1991

En la figura 1 podemos observar como la mejor fuente de carbono para el crecimiento del hongo es la pectina, pero el hongo crece también bien cuando los sustratos elegidos son poligalacturónico o glucosa. Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores (Pardo *et al.*, 1991, Siéssere *et al.*, 1992). En paredes vegetales su crecimiento es más lento alcanzando valores máximos de peso seco inferiores a la mitad de lo que se alcanza con la pectina. Esto se puede deber, al método de extracción de las paredes que no consigue un enriquecimiento en la fracción péctica, a la poca accesibilidad de la fuente de carbono y a que la solubilidad de la paredes es limitada.

El día de máximo crecimiento en galacturónico es el día 9, siendo el peso seco inferior a 1/3 de lo que se observa en pectina. Hemos observado que el galacturónico no puede superar el 1% en el medio de cultivo, superando esta concentración el hongo no sólo no crece apenas sino que no produce enzimas pécticas. Otros autores han observado el efecto del galacturónico sobre el crecimiento. Esto también ha sido observado en otros microorganismos como *Venturia inaequalis* (Kollar, 1998) *Penicillium frequentans* (Siessere *et al.*, 1992), ambos observan como el hongo es incapaz de crecer a altas concentraciones de galacturónico y en todos los casos crece mejor en pectina. Guevara *et al.*, (1997) utilizan en sus cultivos galacturónico encapsulado, que van liberando al medio en pequeñas dosis, precisamente para evitar el efecto negativo de una concentración inicial alta sobre el crecimiento.

En cuanto a la actividad poligalacturonasa (figura. 3) podemos observar como existe una marcada inducción cuando utilizamos pectina, galacturónico (1%), o poligalacturónico. Cuando el hongo crece sobre paredes de tomate, la inducción parece

más pobre, pero si tenemos en cuenta que el crecimiento también es escaso, la actividad específica resultante es similar a la obtenida con pectina. La glucosa actúa como represor de la síntesis de estas enzimas.

Estos resultados concuerdan con los encontrados en la bibliografía, Guevara *et al.*, 1997 demuestran que las poligalacturonasas de FORL r₂ se inducen cuando se utiliza galacturónico como fuente de carbono y se reprimen cuando se utiliza glucosa. García Maceira, concluye que las poligalacturonasas de FOL se inducen por poligalacturónico, pero si detectan niveles basales con glucosa, por lo tanto existen una síntesis constitutiva que es inducible por poligalacturónico y parcialmente reprimible por glucosa. Riou *et al.*, 1992 en sus estudios en *Sclerotinia sclerotiorum* detectan que son la pectina y el poligalacturónico los mejores inductores de las enzimas pécticas. Ellos también detectan niveles basales en glucosa. Blanco *et al.*, 1994 comprueban como las poligalacturonasas en *Saccharomyces cerevisiae* se inducen por galactosa, galacturónico y poligalacturónico y se reprimen por glucosa. En general, todas las enzimas pécticas son inducibles, algunas tienen niveles basales constitutivos, aunque esto no es generalizado, por ejemplo, los resultados obtenidos por De Lorenzo *et al.*, 1987, son bastante similares a los nuestros, es decir las poligalacturonasas *Fusarium moniliforme* se inducen cuando el hongo crece sobre pectina, pero no es posible detectar actividad poligalacturonasa cuando el hongo crece sobre glucosa.

Cuando utilizamos galacturónico como fuente de carbono observamos como al superar el 1% P/V en el medio se produce una caída drástica de la actividad. Con un 1,15% de este metabolito en el medio la actividad se reduce más de un 20%. Este efecto había sido constatado ya por numerosos autores. Leone y Van Den Heuvel en *Botrytis cinerea* crece sobre galacturónico 2 mM se induce la actividad poligalacturonasa, sin embargo cuando crece sobre galacturónico 10 mM se reprime la actividad PG. Con los experimentos que realizan pueden concluir que el galacturónico no inhibe a la actividad PG, sino que la reprime. Es decir el galacturónico al ser el producto final de una reacción lo que produce es una represión por producto final de la síntesis. Cuando la concentración supera el 1% la actividad disminuye. Estos resultados indican que el galacturónico es un inductor que puede ejercer a su vez como “represor catabólico” cuando su concentración en el medio supera la que son capaces de utilizar

las células del hongo. Hay otros casos descritos en la bibliografía en los que el hongo no produce enzimas pécticas cuando crece sobre galacturónico (Dean y Timberlake, 1989). Todos estos resultados nos hacen pensar que el galacturónico no es el mejor inductor para la síntesis de poligalacturonasas, y que en caso de utilizarlo, hay que realizar primero un estudio y determinar la concentración idónea. Siessere *et al.*, 1992 también concluyen, tras sus estudios con *Sclerotinia sclerotiorum* que el galacturónico no es el único, ni el mejor inductor para la síntesis de enzimas pécticas.

IV.2.- ISOELECTROENFOQUES ANALÍTICOS

La plasticidad en cuanto a la capacidad de producir diferentes isoformas tiene un gran interés fisiológico.

Las isoformas de poligalacturonasa y pectinesterasa producidas por FORL van cambiando a lo largo del ciclo de crecimiento, normalmente aumentan en número e intensidad de bandas conforme aumenta la edad del cultivo. Lo mismo ocurre con *Botrytis cinerea* (Magro *et al.*, 1980), creciendo sobre pectina de cítrico, en este caso es el día 14 el de más número de bandas de actividad y el de bandas más intensas; el día 7 es el día con menos bandas. Leone y Van Den Heuvel (1987), trabajando también con *Botrytis cinerea*, pero en este caso creciendo en un medio base suplementado con paredes vegetales, ven como el número de bandas es muy escaso los primeros y como van aumentando en número e intensidad las mismas, alcanzándose la máxima variedad los días 6 y 7. Riou *et al.*, 1992 observan como en *Sclerotinia sclerotiorum* aparecen 4 nuevas bandas a lo largo del crecimiento, que no están presentes los primeros días.

El número de bandas de PG y PE también varía en FORL según la fuente de carbono que utilicemos, así en nuestro caso la mayor variedad de PGs se produce cuando utilizamos galacturónico o pectina (Fig. 6 y 7) como fuentes de carbono. Con poligalacturónico (Fig. 8) sólo se detectan 2 bandas de PG y con paredes de tomate sólo 1 (Fig. 9). En cambio cuando estudiamos las PEs, el máximo número de bandas se observa cuando el hongo crece sobre paredes. Esto probablemente sea debido a que la alta esterificación de las paredes. El bajo número de bandas de poligalacturonasa probablemente se deba a que las paredes con las que hemos trabajado no han sufrido en

al proceso de extracción ningún enriquecimiento en la fracción péctica; probablemente la molécula inductora para otras PGs no está accesible.

Otros autores han descrito ya la influencia de la fuente de carbono en la producción de enzimas. Así Marciano *et al.*, 1982, observan como el patrón de PGs obtenido cuando el micelio crece sobre pectina es diferente que cuando crece sobre poligalacturónico. Leone y Van Den Heuvel (1986) también observan como en *B. cinerea* el patrón de PGs cambia drásticamente cuando variamos la fuente de carbono, así la mayor variedad se produce cuando el hongo crece sobre paredes. En este caso incluso se observa como las isoformas varían en función de la concentración de la fuente de carbono. Guevara *et al.*, 1997, observan como en FORL el patrón de PGs, liasas y PE, varía según la fuente de carbono utilizada y su concentración, apareciendo o desapareciendo isoformas y modificando su intensidad según la fuente de carbono que se utilice. Di Pietro y Roncero (1996) obtienen unos resultados parecidos en FOL, en su caso sólo aparece una banda en glucosa; el número e intensidad de bandas se incrementa en el resto de las fuentes de carbono ensayadas y se puede observar como en poligalacturónico hay una mayor inducción de PGs ácidas, mientras que en pectina se inducen más las PGs neutras; en poligalacturónico aparece una banda nueva, con un pI aproximado de 8.7.

Algunos autores han intentado utilizar los patrones de isoformas para estudios de taxonomía y tipos patogénicos como las formas especiales o razas, sin embargo con los datos que disponemos en la actualidad el análisis isoenzimático de FORL está lejos de proporcionar una relación clara entre el polimorfismo isoenzimático y formas patogénicas. En muchos casos se han encontrado más diferencias en el patrón isoenzimático entre aislamientos de la misma forma especial que entre distintas formas especiales (Scala *et al.* 1981).

Centrándonos en la pectina y el galacturónico, que son en nuestro caso los mejores inductores, el patrón de isoformas obtenido el día de máxima actividad es similar al obtenido por otros autores. Scala *et al.*, (1981) observan que en *Fusarium oxysporum* aparecen 2 bandas mayoritarias con pI 6,75 y 7,20; Di Pietro y Roncero (1996) observan que cuando FOL crece en pectina las bandas mayoritarias tienen unos

pI de 6,75 y 7,0 aproximadamente; Fernández *et al.*, 1992 también obtienen en FOL y FORL creciendo en pectina bandas mayoritarias con pI de 7,0 y alrededor de 6,7. En nuestro caso tanto en pectina como en galacturónico aparece una banda mayoritaria con pI alrededor de 7,0. En ambos casos aparece también una banda con pI alrededor de 6,6.

La existencia de múltiples isoformas es importante por varias razones:

- Primero, es esencial que el patrón con un mismo inductor varíe a lo largo del tiempo, ya que enzimas que son importantes en los primeros estados de la inducción, pasan a ser ineficaces en cultivos más viejos cuando los grandes polímeros son desplazados por otros oligómeros más pequeños. Cuando esto ocurre estas enzimas iniciales deben ser reemplazadas por otras con distintas propiedades bioquímicas que producirán productos más fácilmente asimilables por el hongo
- En segundo lugar la existencia de múltiples isoformas le confiere una ventaja añadida al patógeno, le permite que se adapte mejor a diferentes condiciones ambientales, le da mayor flexibilidad y/o le hace que sea más activo y estable dentro de unos hospedadores que dentro de otros, es decir según en el hospedador que se encuentre producirá unas isoformas distintas que le hacen ser estable dentro de ese hospedador, pero no de otros.

Las múltiples isoformas podrían ser el resultado evolutivo de un patrón simple de enzimas, que debido a cambios en el hospedador o en el ambiente, va variando. De acuerdo con esto más poligalacturonasas implican mayores oportunidades para inducir enfermedad en distintos patógenos (Magro *et al.*, 1980, Marciano, *et al.*, 1982; Wijesundera *et al.*, 1984; Forster y Rasched, 1985; Pérez Artés y Tena, 1990)

La existencia de múltiples isoformas en unos casos es debida a la existencia de varios genes como ocurre por ejemplo en *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp. (Martel *et al.*, 1996; Reymond *et al.*, 1994, Bussink *et al.*, 1992; Stratilova *et al.*, 1993,) o, en el caso de que exista un único gen, se deberán a modificaciones post-transcripcionales, diferencias en los patrones de glicosilación o

proteolisis después de la secreción como ocurre en *Fusarium moniliforme* (Caprari *et al.*, 1993 a, De Lorenzo *et al.*, 1987).

IV.3.- CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA.

Con esta técnica intentamos conocer los tipos de oligosacáridos liberados y distinguir así las actividades de tipo “endo” de las de tipo “exo”. Los estudios se realizaron por un lado para conocer más profundamente el complejo multienzimático producido por el hongo y por otro para ver cuales eran las condiciones idóneas para la producción de actividad exopoligalacturonasa, que era la actividad que nosotros queríamos purificar y caracterizar.

La mayoría de los hongos patógenos de plantas producen los dos tipos de enzimas (Aguilar *et al.*, 1991; Riou *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 1993; Sakai *et al.*, 1993).

Ambas enzimas, no solo difieren en el mecanismo de acción sino que además se les supone distinto papel durante la patogénesis. Las endoPGs son enzimas capaces de producir maceración en los tejidos y muerte celular (Bateman y Bashman, 1976; Cooper, 1983). Debido a esta capacidad de macerar tejidos serían muy importantes a la hora de la penetración del patógeno (Huang y Allen, 1997). Estas enzimas generan oligogalacturónidos que probablemente están implicados en la inducción de los mecanismos de defensa de la planta (Walton, 1994). Las exoPGs, sin embargo son capaces de liberar azúcares simples a partir del polímero que servirían para sostener el crecimiento del patógeno, la inducción de nuevas enzimas y completar el proceso de invasión, incluso algunos autores (Riou *et al.*, 1991) han afirmado que las exoPGs con la ayuda de esterases serían capaces de macerar un tejido.

En nuestro caso podemos observar como *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* produce también una mezcla de ambas actividades, en todas las fuentes de carbono ensayadas excepto cuando el hongo crece en poligalacturónico en el que únicamente somos capaces de detectar actividad endopoligalacturonasa. En el día correspondiente al primer pico de actividad, los productos finales que se obtienen son

mayoritariamente dímero, trímero u oligómeros de mayor tamaño, se acumula el dímero y no detectamos el monómero ni siquiera a tiempos largos de reacción (24 horas). Todo esto nos hace pensar que aunque exista una mezcla de actividades la mayoritaria es de tipo “endo”. Según algunos autores (Kubicek, *et al.*, 1993; Martel *et al.*, 1998, Huang y Allen, 1997) estas enzimas que se producen en los primeros momentos serían muy importantes a la hora de iniciar el proceso inductivo, estas son esenciales para la degradación inicial del polímero liberando productos que reprimirían su síntesis e inducirían la secreción de otras enzimas con distintas propiedades bioquímicas.

Cuando estudiamos el comportamiento de los extractos correspondientes al segundo pico de actividad vemos que excepto en los de crecimiento sobre poligalacturónico, el comportamiento es radicalmente distinto. Aquí ya vemos que aparece ya actividad tipo “exo”, mezclada con “endo”, en el caso de los extractos de galacturónico, o sola, en el caso de los extractos de crecimiento sobre paredes de tomate o pectina. La actividad “exo” sería muy importante proporcionando nutrientes al hongo, ya que libera el monómero que es un producto fácilmente asimilable por el mismo. En los extractos de pectina observamos un comportamiento típico de una exopoligalacturonasa de hongos, es decir liberación exclusiva del monómero incluso a tiempos cortos (15 min) y la incapacidad de degradar totalmente el sustrato.

En el caso de galacturónico observamos como existe una mezcla de ambos tipos de actividades, ya desde los primeros momentos somos capaces de detectar actividad exo puesto que se libera el monómero, y a los 30 min ya apreciamos como el trímero y el dímero producidos por la endo van desapareciendo (gracias a la acción de la actividad exo, única capaz de degradarlos). También observamos la acción de la endo, bastante activa, ya que en 30 minutos ya no detectamos sustrato (poligalacturónico).

En el caso de crecimiento sobre paredes el comportamiento es prácticamente igual al de la pectina.

En poligalacturónico, como ya hemos comentado, somos incapaces de detectar ningún tipo de actividad exo, se va acumulando el trímero como principal producto de reacción, es decir todas características típicas de una ruptura tipo endo.

IV.3.1.- Degradación del digalacturónico y el trigalacturónico por las PGs producidas el día 2 y 6 de crecimiento sobre pectina

Ya centrándonos en el crecimiento sobre pectina de manzana estudiamos la degradación del dímero y el trímero por las enzimas producidas por FORL los días 2 y 6 de crecimiento, para comprobar realmente que la del día 2 se trataba de una actividad tipo endo y la del día 6 de una actividad tipo exo.

En la actividades con comportamiento tipo endo la eficacia de la degradación va disminuyendo conforme la cadena de polímero se va acortando, normalmente son incapaces de degradar el dímero y si degradan el trímero lo hacen a una velocidad bajísima (Sakai, *et al.*, 1993). Estas son características que no cumplen las actividades tipo exo, por lo que un buen mecanismo para conseguir distinguirlas suele ser su diferente comportamiento frente al dímero y trímero.

La actividad producida el día 2 es incapaz de degradar el dímero y el trímero aún en periodos de incubación largos (24 horas), es decir, un comportamiento típico de actividades endo (Fig.-14). Además observamos que la formación de trímero es mayor que la de dímero indicando que sólo los oligogalacturónidos de tamaño mayor al tetrámero son degradados por degradados por la enzima. En la literatura hay algunos ejemplos de endoPGs que son capaces de degradar trigalacturónidos (Rexova-Benková y Markovick, 1976), sin embargo estas enzimas suelen degradarlo a mucha menor velocidad que los oligosacáridos, por ejemplo *Saccharomyces fragilis* degrada el trímero a una velocidad de 1/50 la velocidad con que degrada el tetrasacárido y en el caso de *Aspergillus niger* la relación es 1/20.

La actividad producida el día 6 es capaz de degradar ambos sustratos. Cuando el sustrato es el dímero, ya desde los 5 min. va apareciendo el monómero como producto de reacción; a la hora ya se ha degradado el sustrato totalmente, apareciendo sólo el monómero (Fig.- 15). Cuando el sustrato es el trímero ocurre lo mismo, es decir desde los primeros instantes de la reacción (5 min.) ya detectamos los productos de la reacción (monómero y dímero); cuando se alcanza una hora de reacción todo el dímero el trímero ha pasado a monómero.

Con este comportamiento podemos afirmar que las actividades producidas el día 2 y el día 6 por FORL cuando crece en pectina son distintas, teniendo claramente la del día 2 un comportamiento tipo endo y la del día 6 tipo exo.

IV.4.- REPRESIÓN POR GLUCOSA DE LA POLIGALACTURONASA

La actividad poligalacturonasa necesita para producirse, la existencia en el medio de cultivo de un inductor. En glucosa no se detectaban ni siquiera niveles basales.

Las poligalacturonasas de hongos muestran una gran variabilidad en cuanto a la regulación de su producción (De Lorenzo *et al.*, 1987; Robson *et al.*, 1989). Numerosos autores habían descrito el hecho de que las poligalacturonasas se reprimían por glucosa (De Lorenzo *et al.*, 1987; Kester *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1994; Pardo *et al.*, 1991) y sin embargo aunque la glucosa normalmente actúe como represor, en muchas otras su síntesis no es reprimida por este metabolito (Riou *et al.*, 1991; Riou, *et al.*, 1992; Leone y Van Den Heuvel, 1986). En todos estos casos si el inductor esta presente en el medio se produce la síntesis de estas enzimas, independientemente de los niveles de glucosa presentes en el medio.

Para comprobar si esta actividad, además de ser inducible, se reprimía por glucosa realizamos una serie de experimentos que consistían en iniciar el crecimiento del hongo con un metabolito inductor junto con glucosa.

Con estos experimentos hemos podido comprobar claramente como la glucosa reprime la síntesis de PG, ya que aún en presencia de inductor somos incapaces de detectar la actividad PG, hasta que los niveles de glucosa en el medio son cercanos a cero. Una vez que se termina la glucosa el hongo es capaz de iniciar su proceso inductivo, logrando producir niveles de actividad próximos a los del cultivo en medio inductor, aunque la aparición de las actividades se retrasa (Fig.- 17 y 18). Estos resultados son similares a los obtenidos por Polizeli *et al.*, (1991) trabajando con *Neurospora crassa*, ellos observan como cuando el hongo crece sobre pectina se produce inducción de la actividad, pero cuando se mezcla la pectina con glucosa se

produce una represión de la actividad poligalacturonasa y el carácter inductor no se puede observar hasta que la glucosa no desaparece del medio. Fraissinet y Fevré (1996), demuestran como las poligalacturonasas producidas por *Sclerotinia sclerotiorum* son reprimidas por glucosa. Ellos añaden un 2% de glucosa a cultivos con diferentes concentraciones de galacturónico (metabolito inductor) y ven como la glucosa evita la síntesis de todas las enzimas pectinolíticas. El efecto represor de la glucosa se nota incluso en la marcada reducción de los niveles de proteínas extracelulares.

En los extractos en los que se había añadido el pulso de glucosa, la aparición de la actividad PG se retrasa hasta después del día 4, aunque posteriormente el valor de actividad máxima es mayor, probablemente debido a la mayor masa de micelio (Fig.-19). Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos por Siessere *et al.*, (1992), ellos añaden un pulso de glucosa al inicio del cultivo y a las 12 horas cuando *Penicillium frequentans* está creciendo sobre pectina, en el primer caso observan como la aparición de la actividad se retrasa, y en el segundo caso, en el que ya había aparecido la actividad, observan como al añadir el pulso los niveles de actividad se estabilizan, y no vuelven a aumentar hasta que la glucosa no se ha consumido. El que los niveles de actividad permanezcan estables nos indica que la glucosa no inactiva a la poligalacturonasa, sino que simplemente reprime su síntesis. Pardo *et al.*, (1991) obtienen resultados similares trabajando con *Geotrichum lactis*, en este caso la adición de glucosa el día 3 de crecimiento a cultivos en medios inductores, reprime la síntesis de PG, manteniéndose estables los niveles de PG que existían en el momento de la adición.

Nuestros resultados son corroborados por los obtenidos por Posada (Congreso Nacional de Fitopatología, 1998) sus experimentos se centran en el control genético de la síntesis de los genes de exoPG y endoPG de FORL, demostrando que la síntesis de ambos está regulada a nivel transcripcional, no apareciendo mensajeros cuando el hongo está creciendo en glucosa, es decir la síntesis de ambos es reprimida por glucosa (Patiño *et al.*, 1997).

IV.5.- CARACTERIZACIÓN DE LA EXOPG PREVIA A SU PURIFICACIÓN.

Como ya hemos comentado las condiciones elegidas para obtener exoPG para su posterior purificación fueron 6 días de crecimiento en estático, utilizando como fuente de carbono inductora la pectina de manzana, debido a varios motivos:

- No presentaba problemas de concentraciones críticas por encima de las cuales no creciese el hongo o no se produjese inducción.
- El día 6 de cultivo se producen exclusivamente actividades exo.
- El patrón isoenzimático es el más parecido al obtenido sobre plantas de tomate.

En el diseño de un proceso óptimo de purificación hay que tener en cuenta distintos parámetros: maximizar el rendimiento y la pureza y minimizar el número de pasos y el coste global del proceso. Para ello se realizó un estudio previo de la actividad poligalacturonasa del extracto enzimático con el fin de conocer las condiciones óptimas para la manipulación del mismo. Esto nos sirvió también para conocer las condiciones óptimas para valorar la actividad.

En cuanto a la temperatura a la que debíamos realizar los procesos, no hubo ningún problema debido a que se trata de una actividad bastante estable a temperatura ambiente, sobre todo en los pasos iniciales de la purificación. No se utilizó la temperatura óptima de la actividad para las valoraciones por ser excesivamente alta y porque se obtienen buenos resultados con la temperatura utilizada.

Se estudio la influencia de varios iones y compuestos en la actividad, entre los resultados obtenidos destaca la influencia del calcio sobre la actividad, este produce un fuerte efecto inhibitorio que se hace patente ya a concentraciones bajas (0,25 mM); a concentraciones superiores a 1mM somos incapaces de detectar la actividad, este efecto ya había sido descrito por numerosos autores (Pagel y Heitefuss, 1990; Polizeli *et al.*, 1991; García Maceira *et al.*, 1997) y se debe probablemente a interferencias con el sustrato, mas que a un efecto directo sobre la enzima (Riou, *et al.*, 1991). El calcio forma complejos insolubles con el sustrato, la formación de puentes de calcio actúa como barrera frente a la degradación del polímero. A concentraciones altas de calcio se

produce la formación de una especie de gel que restringe la movilidad enzimática y puede ser causa de adsorción de la enzima. Cooper (1978), trabajando con diferentes aislamientos de *Fusarium oxysporum* detecta inhibición de la actividad, pero son necesarias concentraciones más altas de calcio (10 mM) para que este efecto se haga patente. Nuestros resultados son más parecidos a los obtenidos por Pérez Artes y Tena (1990), ellos trabajando con *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* detectan inhibición de la actividad a partir de 0,5 mM. Resultados similares obtienen Vázquez *et al.*, (1986) trabajando con poligalacturonasas de *Alternaria alternata*. La influencia que ejerce el calcio sobre la actividad PG es uno de los factores que se utilizan a la hora de diferenciar una PG de una PL, ya que estas últimas no sólo no se inhiben por calcio, sino que es un cofactor necesario para su actividad.

La actividad disminuye también cuando añadimos otros cationes divalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} o Co^{2+} , resultados que concuerdan con otros encontrados en la bibliografía (Pagel y Heitefuss, 1990; Polizeli *et al.*, 1991; Riou, *et al.*, 1992).

Un ion que también tiene un efecto característico es el mercurio, este provoca inhibición total de la actividad incluso a concentraciones bajas (0,25 mM); esto es debido, probablemente, a la presencia de grupos tiol en el centro activo de la enzima y es una característica típica de las exoPG, que no es compartida por las endoPGs. El efecto del mercurio sobre la actividad exoPG ya había sido descrito por algunos autores (García Maceira *et al.*, 1997; Riou *et al.*, 1992; Martel *et al.*, 1996).

El EDTA también influye en la actividad, este compuesto es un agente quelante de cationes divalentes, como el calcio que como hemos visto inhibe a la actividad PG. Cuando la concentración de EDTA no supera 5 mM notamos una influencia positiva sobre la actividad (más actividad que en el control), esto probablemente es debido a que esta eliminando restos de calcio u otros iones presentes en el cultivo en cantidades muy pequeñas pero que pueden llegar a afectar a la actividad.

IV.6.- PURIFICACIÓN DE LA EXOPOLIGALACTURONASA.

La purificación de la exoPG tuvo bastantes dificultades debido entre otras cosas a que no se trataba de una actividad mayoritaria en el extracto, a que la carga neta de la proteína no debía ser muy alta por lo que había que utilizar pH extremos en las columnas de intercambio para conseguir unirla a las matrices de la columna y fundamentalmente a la presencia de pigmentos en la muestra que dificulta todos los pasos de la purificación y cuando se utilizaros métodos para eliminarlo observamos una notable pérdida de actividad, ya que debe contribuir a la estabilización de la proteína.

En el primer paso de un proceso de purificación es necesario separar el mayor número posible de impurezas y concentrar lo máximo posible las proteínas que nos interesan de las presentes en el extracto enzimático. Este paso debe ser lo más rápido y sencillo posible. De los métodos ensayados para concentrar volúmenes grandes elegimos la filtración tangencial ya que era con el que más actividad específica y grado de purificación obteníamos. El rendimiento era un poco superior cuando precipitábamos con sulfato amónico al 90%, pero este método tiene varios inconvenientes, primero es más caro que la filtración tangencial, segundo es un método más lento y laborioso, ya que el sulfato amónico, para obtener este rendimiento, hay que añadirlo en frío, lentamente y después centrifugar en frío y tercero después de esto hay que dializar durante bastante tiempo, con varios cambios de tampón ya que es difícil eliminar los restos de sulfato amónico. Con la filtración tangencial, el extracto sale dializado en el tampón que elijamos.

El resto de los métodos ensayados ofreció peores resultados, el único que se acercaba más a los dos citados con anterioridad fue la filtración no tangencial. Este método fue el elegido en los otros pasos de la purificación, cuando queríamos concentrar volúmenes pequeños.

El siguiente paso de la purificación fue una cromatografía de exclusión molecular (Bio-Gel P100), con este paso se pretendió eliminar la mayor parte del color presente en la muestra y al mismo tiempo eliminar las proteínas con distinta masa molecular que la nuestra. El rendimiento obtenido en este paso fue un 63%, semejante o

un poco superior al obtenido por otros autores en un paso similar de purificación de exoPG (Martínez *et al.*, 1991; Pardo *et al.*, 1991; Riou *et al.*, 1992).

El siguiente paso de la purificación fue un intercambio iónico en columna de alta eficacia (Mono-Q), equilibrada en tampón fosfato pH 8.2. con este paso lográbamos separar un pico mayoritario de actividad PG que fue la que denominamos PG₁, aunque aparecía actividad PG en otros 2 picos más. Tenemos que recordar que el día 6 aparecían varias formas de poligalacturonasa, alguna de ellas probablemente se habrá perdido en los pasos anteriores de purificación (en los que también había actividad en el extracto descartado), las que quedaban se separan en este último paso. En este paso, por tanto logramos purificar casi 33 veces la PG₁ con un rendimiento de 8,6. La PG₁ así obtenida era totalmente homogénea.

Aunque el rendimiento global del proceso de purificación parece pequeño, es superior a otros descritos en la bibliografía para exoPGs, así por ejemplo la exoPG de *Aspergillus tubingensis* el rendimiento fue de un 2,3% (Kester *et al.*, 1996) y en *Alternaria mali* se han purificado tres exoPGs con rendimientos de un 4,7; 6,0 y 6,4%. (Nozaki *et al.*, 1997). Sin embargo en el caso de una exoPG de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* el rendimiento fue bastante superior (27,8 %) a pesar de que los pasos utilizados para su purificación fueron semejantes a los nuestros (Martínez *et al.*, 1991). Aunque en los isoelectroenfoques no se detectan bandas de poligalacturonasa con pI tan alto como 8,25, con pH inferiores a este valor no conseguimos que la proteína se una a la columna. Esto puede ser debido a que la exoPG tenga poca carga neta y esto unido a interferencias con el tampón (el tampón fosfato tiene carga negativa y puede competir con la proteína en su unión al lecho positivo de la columna), hace que el pH que tenemos que usar sea tan alto, pudiendo contribuir a inestabilizar algo la enzima (aunque es bastante estable a ese pH). Cuando probamos con una columna de lecho negativo, pasaba prácticamente igual, teníamos que usar unos pH muy bajos para conseguir que la proteína se pegara a la columna. Esta opción se descartó porque la enzima es menos estable a pH bajos.

La proteína así purificada nos sirvió para su posterior caracterización (pH óptimo, estabilidad al pH, temperatura óptima, estabilidad a la temperatura, masa

molecular, pI, modo de acción de la enzima, ensayos de afinidad por distintos sustratos, comprobación de que era una glicoproteína y ensayos con inhibidores), pero en algunos casos necesitábamos una cantidad mayor de enzima (producción de anticuerpos, obtención de la secuencia amino terminal y de un péptido interno y composición de aminoácidos), en estos casos la proteína se purificó mediante electroelución y posteriormente se precipita con etanol para quitarle el color. Con esto conseguimos una purificación más rápida y eficaz, pero tiene inconvenientes, primero se deben conocer las características de la enzima y segundo que sólo se puede usar en ensayos en los que no sea necesario que la enzima mantenga la actividad, ya que la enzima electroeluida prácticamente no tiene actividad.

IV.7.- CARACTERIZACIÓN DE LA PG₁

La PG₁ es una exoPG con una masa molecular de 68 kDa, similar o incluso igual a la de otras exoPG descritas (Kester *et al.*, 1996; Riou *et al.*, 1992; García-Maceira *et al.*, 1997; Nozaki *et al.*, 1997) cuyas masas moleculares oscilan entre 60 y 80 kDa. Las endoPG son generalmente más pequeñas oscilando su masa molecular entre 30 y 45 kDa (Martel *et al.*, 1996; Arie *et al.*, 1998; Di Pietro *et al.*, 1998; Clay *et al.*, 1997). No es una proteína formada por varias subunidades, característica que comparte con el resto de las poligalacturonasas.

La PG₁ es una glicoproteína, la parte glucídica de la enzima es aproximadamente un 29%, es decir un porcentaje bastante elevado que confiere gran estabilidad a la enzima, pero al mismo tiempo complica considerablemente los intentos de romper o secuenciar la proteína. Casi todas las poligalacturonasas descritas en la bibliografía son glicoproteínas (Strand *et al.*, 1975; De Lorenzo *et al.*, 1987; Arie *et al.*, 1998; Nozaki *et al.*, 1997; Di Pietro y Roncero, 1996) y en general están fuertemente glicosiladas, esta característica suele ser común entre las proteínas extracelulares. En el caso de las poligalacturonasas generalmente la unión del azúcar a la proteína se produce exclusivamente mediante enlaces N-glicosídicos, característica compartida también por la PG₁, ya que conseguimos desglicosilarla totalmente mediante enzimas, como la endo-H que rompen exclusivamente este tipo de enlace.

El pI de la PG₁ es aproximadamente 6,5, en este caso suele haber más variabilidad entre la poligalacturonasas, ya que como hemos comentado normalmente un aislamiento secreta varias isoformas dependiendo de las características del cultivo. Normalmente el rango de pI de las PGs suele estar entre 3,8 a 7,5 (Magro *et al.*, 1980). El pI de la PG₁ es bastante similar al estimado para una exoPG de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Martínez *et al.*, 1991) y para una exoPG de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (García-Maceira *et al.*, 1997).

El pH óptimo de la PG₁ coincide con los estudios realizados acerca del pH óptimo de las PGs, las cuales presentan en general, tanto si son endo como exo, valores de pH óptimo entre 4,0 y 6,5 (Keon *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1988; Pérez Artes y Tena, 1989). La drástica reducción de la estabilidad al pH observada entre pH 6,0 y 7,0, se debe probablemente a que en este intervalo de valores se encuentra el pI de la enzima. Es sabido que el pH al cual una proteína presenta un mínimo de solubilidad es su pI, definido como aquel valor de pH en el que la proteína no presenta carga eléctrica. En estas condiciones no existe repulsión electrostática entre las moléculas tendiendo estas a coalescer y precipitar. La proteína precipitada pierde su actividad.

En cuanto a la temperatura óptima de la PG₁ es similar a otras exoPGs de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (García-Maceira *et al.*, 1997; Di Pietro y Roncero; 1996), *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* (Pérez Artes y Tena, 1990) y algo superior a otras citadas en la bibliografía para *Pseudomonas solanacearum* (Schell *et al.*, 1988) *Alternaria mali* (Nozaki *et al.*, 1997), *Aspergillus tubingensis* (Kester *et al.*, 1996), *Geotrichum lactis* (Pardo *et al.*, 1991) o *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou *et al.*, 1991), todas estas PGs tienen una temperatura óptima en torno 40 °C, inactivándose parcial o totalmente a temperaturas próximas a la óptima de la PG₁ de FORL (60 °C). Esta enzima también es bastante estable a la temperatura haciendo falta 15 min a 65 °C para inactivarla totalmente. Su termoestabilidad es superior a la de otras enzimas pécticas de hongos (Ishii *et al.*, 1975; Baldwin *et al.*, 1989) incluidas la mayoría de las anteriormente citadas, aunque es semejante a la de las pectinliasas de *Penicillium italicum* (Alaña *et al.*, 1991). Esta alta estabilidad puede ser debida a su alto contenido en azúcares, que de alguna manera ayuden a su plegamiento y la estabilicen.

Según Rombouts (1980), la K_m para la hidrólisis de su sustrato de la mayoría de las PGs es inferior a 1 mg/ml, aunque también se han descrito PGs con valores de K_m superiores a este valor como la de *Neurospora crassa* con K_m de 5,0 mg/ml (Polizelli *et al.*, 1991). En nuestro caso los valores se ajustan al modelo propuesto por Rombouts, siendo la K_m para el poligalacturónico de 0,64 mM (0,13 mg/ml); la K_m para el digalacturónico de 1,17 mM (0,24 mg/ml) y la K_m para el trigalacturónico de 0,99 mM (0,20 mM). Las K_m para el dímero y el trímero son muy parecidas a las obtenidas por Kester *et al.*, (1996), para una exoPG de *Aspergillus tubingensis*. Estos autores sostienen que la K_m y la V_{max} dependen del grado de polimerización de la cadena de sustrato, los valores de K_m decrecen (en oligogalacturónidos con grado de polimerización de 2 a 7) con el incremento de la longitud de la cadena. En nuestro caso también ocurre ya que la K_m del trímero es más pequeña que la del dímero. Otros autores obtienen K_m para exoPG con el dímero y el trímero como sustrato más pequeñas que las nuestras, este es el caso de Nozaki *et al.*, 1997, que obtiene valores considerablemente más pequeños en 3 exoPGs de *Alternaria mali*.

El valor de la K_m para el polímero fue semejante al obtenido por Pardo *et al.*, 1991, ellos obtienen una K_m de 0,09 mg/ml en una exoPG de *Geotrichum lactis*. Sin embargo entre las K_m de la exoPG publicadas observamos diferencias abismales, los valores van desde K_m para el poligalacturónico de 0,09 mg/ml hasta valores como los observados para una exoPG de FOL de 25 mg/ml (García Maceira *et al.*, 1997), pasando por los de una exoPG *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Martínez *et al.*, 1991), los de la exoPG de *Aspergillus tubingensis* (Kester *et al.*, 1996) y los de una exoPG de *Neurospora crassa*, que son de 1,2 mg/ml, 3,2 y 5,0 mg/ml. Además de estas diferencias observamos datos contradictorios como los observados por García-Maceira *et al.*, (1997) que obtienen valores de K_m más altos para el poligalacturónico que para la pectina, siendo el primero el sustrato típico de las poligalacturonasas y el segundo el de las polimetilgalacturonasas.

Como vemos hay pocos estudios hechos con las K_m y los resultados no son muy homogéneos, esto puede ser debido a que los sustratos son polímeros complejos muchos de ellos difíciles de obtener o a la escasez de exoPGs purificadas y la dificultad que conlleva su purificación que hace que se realicen pocos estudios de este tipo.

Como siguiente paso nos planteamos conocer la composición de aminoácidos de la proteína, como hemos dicho hay pocas exoPG purificadas y de estas solo 3 exoPG de hongos tienen publicada su composición de aminoácidos, la de *Aspergillus tubingensis*, *Cochliobolus carbonum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En la tabla 4.1 podemos ver las composiciones de aminoácidos de las 4 exoPGs.

| Aminoácido | FORL | <i>A.tubingensis</i> | <i>C.carbonum</i> | FOL |
|------------|------|----------------------|-------------------|-----|
| As- (D)(N) | 57 | 65 | 67 | 65 |
| Thr (T) | 34 | 34 | 26 | 35 |
| Ser (S) | 42 | 42 | 40 | 42 |
| Gl- (E)(Q) | 46 | 27 | 30 | 26 |
| Gly (G) | 96 | 41 | 46 | 35 |
| Ala (A) | 44 | 20 | 27 | 27 |
| Cys (C) | 2 | 11 | 11 | 10 |
| Val (V) | 27 | 29 | 33 | 32 |
| Met (M) | 4 | 5 | 4 | 7 |
| Ile (I) | 21 | 30 | 36 | 27 |
| Leu (L) | 29 | 33 | 30 | 34 |
| Tyr (Y) | 4 | 19 | 13 | 17 |
| Phe (F) | 21 | 15 | 19 | 15 |
| His (H) | 9 | 9 | 3 | 8 |
| Lys (K) | 33 | 17 | 28 | 27 |
| Arg (R) | 13 | 11 | 10 | 21 |
| Pro (P) | 22 | 14 | 18 | 18 |

Tabla 4.1.- Composición de aminoácidos de las exoPGs de FORL, *A. niger* (Kester *et al.*, 1996), *C. carbonum* (Scott-Craig *et al.*, 1998) y FOL (obtenido mediante el BLASTX).

Estas 4 exoPG se diferencian en el tamaño, como hemos dicho la masa molecular de la exoPG FORL es 68 kDa (50 kDa desglicosilada), la de *C. carbonum*, (Scott-Craig *et al.*, 1998) es 60 kDa (45 kDa desglicosilada), la de *Aspergillus tubingensis* (Kester *et al.*, 1996) es 78 kDa (entre 52 y 55 kDa desglicosilada) y la de FOL (García-Maceira *et al.*, 1997) es 63 kDa (45 kDa, desglicosilada), estas diferencias en tamaño podrían explicar parte de las diferencias observadas, es decir a mayor tamaño mayor número de aminoácidos, en general. Las exoPG de FOL y *C. carbonum* son las más semejantes a nivel de aminoácidos, y también lo son en cuanto a masa molecular una vez desglicosilada la proteína.

En nuestro caso, podemos observar que el aminoácido mayoritario es la glicina, este es un aminoácido polar sin carga, y su pequeño residuo contribuye al plegamiento de la proteína. La alanina, treonina y la serina, suelen ser aminoácidos bastante mayoritarios en las poligalacturonasas (Reymond *et al.*, 1994; Fraissinet –Tachet *et al.*, 1995). En nuestro caso también lo son. Las mayores homologías, entre todos los hongos citados, en cuanto a número de residuos de aminoácido por molécula en concreto se dan en la treonina, serina, valina y metionina. Entre FORL, FOL y *A.tubingensis* también es similar el número de histidinas por molécula y entre FORL, *A.tubingensis* y *C. carbonum* es similar el número de argininas siendo muy superior en el caso de FOL.

Cabe destacar el bajo número de cisteínas que tiene nuestra exoPG si lo comparamos con el resto, es decir nuestra molécula tendría pocos puentes disulfuro, que se forman entre residuos de cisteína libres.

En cuanto a la basicidad de la proteína, la más básica parece ser la de FOL y la menos básica la de *A. tubingensis*. Estos resultados obtenidos a partir del número de aminoácidos básicos por molécula coinciden con los publicados sobre su punto isoelectrico, ya que la de FOL tiene un pI de 7,0 y la de *A. tubingensis* tiene un pI entre 3,7 y 4,2.

IV.8.- OBTENCIÓN DE UNA SONDA PARA LA EXOPG

Para obtener la sonda necesitábamos obtener la secuencia amino terminal de la proteína y la secuencia de un péptido interno (o bien la secuencia de 2 péptidos internos alejados entre sí). La obtención de la secuencia amino terminal fue bastante complicada ya que, como hemos dicho, la proteína está fuertemente glicosilada y plegada, esto hizo que los primeros intentos nos dieran como resultado que el extremo amino estaba bloqueado, en otras exoPG ha ocurrido lo mismo (Scott-Craig *et al.*, 1998; García-Maceira *et al.*, 1997), nosotros tras desglicosilar y desnaturalizar la proteína conseguimos secuenciar el amino, por lo que probablemente este no estuviese bloqueado debido a modificaciones de aminoácidos, sino que debido a la alta concentración de azúcares y al plegamiento, la secuenciación era imposible. Una vez

obtenida la secuencia amino terminal, pudimos compararla con otras secuencias publicadas hasta el momento, 3 de distintas exoPG de *A. mali*, una de *A. tubingensis* y otra de FOL (tabla 4.2) y podemos observar que no presenta nada en común con ellas, esto no es extraño, ya que el extremo amino es la parte de las proteínas que más variaciones sufre entre proteínas homólogas, además el número de secuencias amino de exoPG es todavía muy reducido. Esta falta de homología también se ha observado dentro de las endoPG donde el número de trabajos es más numeroso.

| | |
|--------------------------------------|--|
| FORL: | X-X-R-K-V-Y-T-I-R-H-S-K-N-D-N-D-X-V-S-S- |
| <i>A. tubingensis</i> ¹ : | M-R-L-T-H-V-L-S-H-T-L-G-L-L-A-L-G-A-T-A |
| FOL ² : | L-A-F-N-V-P-S-K-P-P |
| <i>A. mali</i> ³ I: | A-K-T-T-T-R-P-Y-S-T-W-M-A-G-S-P-L-S-K-G |
| II: | A-K-T-T-T-R-P-Y-S-T-W-M-S-S-P-L-S-K-G |
| III: | A-K-T-T-T-R-P-Y-S-T-W-M-P-L-P-L-S-K-G |

Tabla 4.2: Comparación del extremo amino terminal de exoPG de hongos . (¹Kester et al., 1996; ²Di Pietro y Roncero, 1996; ³Nozaki et al., 1997).

Como hemos comentado con anterioridad, la obtención del péptido interno fue complicada ya que romper esta proteína tan glicosilada no es fácil. A pesar de ello obtuvimos varios picos de los cuales se eligió el más simétrico para su secuenciación. Se secuenciaron 12 aminoácidos, tamaño suficiente para los estudios posteriores.

La amplificación de ADN de FORL, usando como cebadores las secuencias basadas en los extremos amino terminal y péptido interno de la proteína, nos dio como resultado un fragmento de 755 pb que correspondía a la secuencia parcial del la exoPG. Utilizando el BLASTX (Altschul *et al.*, 1997) observamos como las secuencias con las que presenta más homología son con las tres únicas exoPGs de hongos secuenciadas hasta ahora. Presenta una homología a nivel de proteína del 50 % con la de *C. carbonum*, del 38 % con la de *A. tubingensis* y del 40 % con la de FOL; a nivel de DNA genómico, los porcentajes disminuyen un poco, esto es lógico debido a que no están eliminados los intrones que son las zonas del gen con menor grado de similitud, en este caso las homologías son de un 40% con la de *C. carbonum* y de un 31% con las de *A. tubingensis* y FOL, a la que más se parece como hemos visto, es a la de *C. carbonum*, tanto a nivel de DNA como de proteína.

El número y posición de los intrones no es similar a los presentes en *C. carbonum* o *A. niger*. Este no es un hecho extraño ya que la posición y el número de intrones tampoco se conserva entre los genes de las endo PG de hongos filamentosos, incluyendo a *Fusarium* (Arie *et al.*, 1998, Capari *et al.*, 1993b, Scott-Craig., 1990)

El fragmento que ha sido secuenciado es la zona del gen que presenta menor número de secuencias conservadas, ya que los fragmentos conservados están en su mayoría a partir del residuo aminoacídico 250, el único fragmento conservado que aparece en esta zona es el fragmento NTD (posiciones 182, 183 y 184), que es una secuencia conservada entre todas la poligalacturonasas, ya sean endo o exo, de hongos, bacterias o plantas. Los motivos conservados parecen estar relacionado con la afinidad por el sustrato o con funciones catalíticas.

También hemos podido comprobar que nuestra secuencia, y en general las exoPG presentan mayor homología con las PGs de plantas que con las endoPGs de hongos (Kester *et al.*, 1996).

La obtención de la sonda ha hecho posible la realización de estudios sobre el control genético del gen codificador para la exoPG y el escrutinio de la librería genómica de FORL para obtener la secuencia del gen completo.

IV.9.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA PG₁

La obtención de anticuerpos nos permite localizar la enzima en diferentes situaciones (planta infectada, distintos aislamientos del hongo, distintos hongos, distintos estados de inducción, etc).

Nosotros obtuvimos anticuerpos policlones contra la exoPG purificada y pudimos comprobar mediante DOT-BLOT, que estos anticuerpos son bastante sensibles (detectan una concentración de proteína purificada de 0,1 ng, aunque normalmente utilizamos 10 ng, con una dilución de anticuerpo 1:10000), así por ejemplo los anticuerpos obtenidos por Riou *et al.*, (1992) para una exoPG de *Sclerotinia*

sclerotiorum detectan 2 μ g de proteína purificada con una dilución de anticuerpo 1:2000.

Para corroborar los estudios previos realizados sobre de la inducción de la poligalacturonasa, realizamos un Wester-Blot con extractos de crecimiento en las distintas fuentes de carbono. Como podemos ver en la Fig. 42, la banda de masa molecular equivalente a la exoPG sólo aparece en los cultivos de pectina. En el resto de las fuentes de carbono no aparece señal con una concentración de proteína total de 30 ng. Recordemos que en galacturónico o poligalacturónico la actividad mayoritaria no era de tipo exo, aún así si aumentamos la cantidad de proteína a 600 ng somos capaces de detectar señal todas las fuentes de carbono inductoras; para detectar alguna señal en los extractos de glucosa debemos aumentar hasta 1 μ g la concentración de proteína. En ambos casos a esta señal le acompañan una serie de señales inespecíficas.

Mediante inmunoensayos realizado con extractos de raíz de planta control y raíz de planta infectada y por métodos directos utilizando raíces de planta infectadas y control, pudimos observar mediante estas dos técnicas que la exoPG se expresa en tejidos infectados y que los niveles de señal van aumentando paralelamente al desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Los síntomas comienzan a aparecer a los 14 días, incrementándose a partir de ese momento hasta los 28 días donde la podredumbre alcanza a todo el sistema radicular.

También hemos comentado la homología que existe entre las poligalacturonasas en general, que presentan bastantes secuencias conservadas, y en particular entre las exoPG de hongos y las poligalacturonasas de plantas, lo que explicaría la señal que aparece en la planta control. Estos datos concuerdan con los encontrados para por Arie *et al.*, (1998), ellos trabajan con endoPGs de *Fusarium oxysporum*, y también detectan una pequeña señal en planta control. Este hongo es vascular, por lo que los ensayos se realizan con tallo de planta.

IV.10.- ENSAYOS CON PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA POLIGALACTURONASA.

Las PGIP (proteínas inhibidoras de las PGs) han sido encontradas en una gran variedad de plantas y se consideran factores importantes para la resistencia de plantas frente a hongos patógenos al reconocer moléculas no propias. La interacción es un prerrequisito para el funcionamiento, no sólo de los mecanismos de defensa sino también de la percepción que conduce a la incompatibilidad (Abu-Goukh y Labavitch, 1983; Anderson y Albersheim, 1972; Brown, 1984; Fielding, 1981; Hoffman y Turner, 1982).

Todas las dicotiledóneas examinadas tienen PGIPs asociadas a su pared primaria que pueden inhibir a las endoPGs secretadas por hongos patógenos (Albersheim y Anderson, 1971; Hoffman y Turner, 1982, 1984), pero no a las PGs de plantas, bacterias u otros microorganismos (Cervone *et al.*, 1990). De la interacción o no entre PG y PGIP depende el grado de inhibición, modificaciones por ejemplo en la glicosilación de los inhibidores en plantas transgénicas son suficientes para explicar diferencias de especificidad entre las distintos PGIPs. Las endoPGs se unen fuertemente a la pared de los hospedadores y parece que esta unión se realiza a través de las PGIPs. Hasta el momento no se han determinado sitios de unión similares para las exoPGs.

La inhibición *in vitro* de endoPG por PGIP tiene como resultado la existencia prolongada en la mezcla de digestión de oligómeros con alto grado de polimerización activos en los mecanismos de defensa (Bruce y West, 1982; Cervone *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1986; Walker-Simmons *et al.*, 1983). A partir de estos resultados se ha propuesto la hipótesis de que las PGIPs desempeñan un papel fundamental en la resistencia a patógenos fúngicos, al favorecer la formación de oligosacáridos de un tamaño apropiado para inducir las respuestas de defensa (Cervone *et al.*, 1987). La activación de estos mecanismos así como la lignificación y la síntesis de fitoalexinas depende del grado de polimerización de los oligómeros formados (Brown y Adikaram, 1982; Cervone *et al.*, 1981); el mono y digalacturónico no tendrían este efecto como moléculas activas para la inducción de los mecanismos de defensa.

Las PGIPs no son proteínas únicas, sino que pertenecen a una superfamilia de proteínas especializadas en el reconocimiento de moléculas no propias y sólo recientemente se han empezado a estudiar y caracterizar.

Hasta ahora todos los trabajos publicados hacen referencia a las endoPGs (Fielding, 1981; Cervone *et al.*, 1987; De Lorenzo *et al.*, 1990; Bruce y West, 1982; Laffite *et al.*, 1984, Fisher *et al.*, 1973 etc). Nosotros pensamos que hasta ahora se han realizado pocos ensayos con exoPGs, probablemente durante mucho tiempo se les consideró enzimas menos eficaces en la degradación de sustratos complejos. En los últimos tres años después de algunos resultados contradictorios en los estudios de interrupción génica con endoPGs se ha desencadenado un gran interés en las exoPGs y podríamos estar ante un mecanismo más sofisticado.

Nuestros ensayos demuestran que la exoPG se inhibe con las PGIP (Fig. 46 y 47), aunque estudios previos realizados con estos mismos inhibidores frente a endoPGs de *A. niger*, *F. moniliforme*, FOL (Desiderio *et al.*, 1997) demuestran que estas PGIP inhiben más eficazmente a varias endoPGs que a nuestra exoPG, ya que en todos los casos son necesarias concentraciones al menos 5 veces mayores para conseguir el 100% de inhibición de la actividad. La menor inhibición de la exoPG, como ocurre en nuestro caso o la incapacidad de inhibición en el caso de la exoPG de FOL (Di Pietro y Roncero, 1996), podría ser una ventaja para aquellos hongos que tienen la capacidad de liberar en los primeros momentos de la infección exoPG, de esta manera lograrían escapar de la interacción con las PGIPs, y se liberarían oligómeros más pequeños no vinculados a la inducción de resistencia.

IV.11.- EVIDENCIAS DE LA IMPLICACIÓN DE LAS POLIGALACTURONASAS EN LA PATOGENESIS.

La principal barrera contra los patógenos es la pared celular de las plantas rica en polisacáridos. La mayoría de los patógenos necesitan romperla para acceder a los tejidos de la planta y por este motivo secretan una serie de enzimas capaces de degradar los polímeros de la pared. Invariablemente, cuando un hongo crece sobre paredes de planta, las primeras enzimas que se secretan son las enzimas pécticas, seguidas de celulasas y hemicelulasas (Jones *et al.*, 1972); su acción sobre las paredes es un prerrequisito para la degradación de la pared por otras enzimas, sólo una vez que han actuado las enzimas pécticas, y en particular las poligalacturonasas, la celulosa y

hemicelulosa se hace accesible y así se liberan los inductores de las celulasas y hemicelulasas. Todo esto ha contribuido al interés que siempre han despertado la poligalacturonasas.

Se han realizado numerosos estudios para intentar comprobar la implicación de las poligalacturonasas en la patogénesis. Numerosos autores han reseñado diferentes evidencias bioquímicas de la correlación entre las enzimas degradadoras de la pared celular y los síntomas de las enfermedades (Bateman y Basham, 1976; Collmer y Keen, 1986; Cooper, 1987; Hanh *et al.*, 1989); mediante anticuerpos contra la endoPG se ha visualizado el mecanismo de penetración del hongo y se ha podido observar como esta enzima se localiza en las proximidades del patógeno y no en otros lugares más alejados (Clay *et al.*, 1997) y citoquímicamente se ha podido observar la presencia de ácido galacturónico (producto de degradación de la pectina) en tejidos infectados por FORL, en las proximidades del patógeno (Benhamou *et al.*, 1990c; Chamberland *et al.*, 1989), lo que corrobora la implicación de enzimas pectinolíticas sobre la pared celular durante la entrada del patógeno.

Carder *et al.*, 1987, con un estudio realizado con 46 aislamientos de 4 especies distintas de *Verticillium* sugieren que una alta producción de poligalacturonasas es un prerequisite para la alta virulencia de los aislamientos, es decir los aislamientos que producen bajos niveles de PGs son menos virulentos que los que producen altos niveles.

Otros autores (Keon *et al.*, 1990) demuestran como la maceración en los tejidos es proporcional a la concentración de PGs. Las PGs de *C. lindemuthianum* actuando solas pueden macerar el tejido y matar protoplastos.

Las endoPGs han sido muy estudiadas por su ataque al azar y su posibilidad de macerar tejidos (Bateman y Basham, 1976; Keon *et al.*, 1987), a las exoPGs se les ha prestado menos atención y siempre se les atribuyó un papel secundario, sin embargo en los últimos años están comenzando a despertar gran interés (Kester *et al.*, 1996; Di Pietro *et al.*, 1996; García -Maceira *et al.*, 1997).

A nivel genético los estudios se han encaminado a la interrupción de un gen concreto y ver las consecuencias sobre los síntomas de la enfermedad, o bien en intentar clonar un gen en un microorganismo que no produzca otras enzimas pécticas para ver la implicación de una proteína en particular o mediante mutantes que carezcan de la enzima que queremos estudiar.

En cuanto a los experimentos de clonaje y sobreexpresión, Lei *et al.*, 1985, comprueban como una PG purificada de *Erwinia* es capaz de causar maceración en tejidos de zanahoria y patata. Para demostrar que realmente la maceración es debida a esta enzima y no a posibles contaminaciones, clonan el gen de la PG y lo expresan en *E. coli*, estas células son capaces de macerar tejidos, es decir ellos concluyen que la PG sola es capaz de producir maceración.

Hay numerosos experimentos desarrollados con mutantes que carecen de endoPG, por ejemplo Ried y Collmer en 1988, trabajando con un mutante de *Erwinia chrysanthemi* que tiene mutado el gen de la endo y no produce liasas, habían comprobado como la exoPG que produce es capaz de macerar tejidos. Schell *et al.*, 1988 trabajando con *Pseudomonas solanacearum* ven como mutantes que carecen de la endoPG mayoritaria tienen menos virulencia que los controles sin mutar, pero no la reducen totalmente

Los trabajos de interrupción de genes son numerosos; Di Pietro *et al.*, 1998, observan como el gen PG1 que está muy conservado en *F. oxysporum*, no es esencial para la patogénesis, esto lo comprueban mediante ruptura de este gen en FOL y comprobando como el hongo es capaz de producir la enfermedad a pesar de carecer de este gen. Este hongo aunque no produzca endoPG, produce al menos 2 exoPGS y una liasa que podrían ser capaces de producir la enfermedad, en ausencia de la endo. Scott-Craig *et al.*, 1990, realizan también experimentos de ruptura del gen de la endoPG y ven como el patógeno conserva al menos entre un 25 y un 35% de actividad PG residual que atribuyen a una exo. Ellos comprueban que el mutante sigue siendo patógeno, por lo que concluyen que la endo no es esencial para la patogénesis y que como este hongo no produce liasas las exoPG deberían ser suficientes para provocar la enfermedad.

Como hemos dicho aunque el papel crucial de la patogénesis se le había atribuido a las endoPGs ya son muchos los experimentos que cuestionan que sean las únicas enzimas implicadas y comienzan a dar un papel transcendental en el desarrollo de la enfermedad a las exoPG. Pérez-Artes *et al.*, 1990, han comprobado como la raza 5 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* que sólo produce pectinliasas y exoPGs es capaz de provocar en la planta flacidez y desecación que llevan a la muerte de la misma tras 20 días de la inoculación del hongo. Algunos autores han comprobados como las exoPGs solas o con ayuda de las esterases son capaces de macerar tejidos (Pérez-Artes y Tena, 1990; Scott-Craig *et al.*, 1990) y juegan un papel muy importante en la nutrición del hongo (He y Collmer, 1990).

Las enzimas pécticas, en general, actúan de manera concertada a la hora de degradar la pectina y nutrir al patógeno, esta coordinación es muy importante durante la patogénesis. Normalmente el mecanismo de la patogénesis es concertado y complejo, por lo que la pérdida de un solo gen no suele afectar totalmente a la virulencia. Por todo esto nosotros pensamos que con experimentos de mutagénesis dirigida no se puede asegurar ni descartar la implicación de una enzima en la patogénesis, ya que no sabemos si otras enzimas pécticas presentes en el aislamiento se están sobreexpresando para suplir la ausencia de esta o si simplemente son suficientes por si solas para causar la enfermedad. Además puede haber varios genes de endo o exoPGs en un mismo aislamiento que no se expresen al tiempo sino sólo cuando las condiciones lo requieran.

Los fracasos en el control de las enfermedades provocadas por *Fusarium* a pesar del uso de métodos convencionales como fungicidas, agentes de biocontrol, suelos mejorados, cultivos resistentes etc. puede deberse al pobre conocimiento de los mecanismos de desarrollo de la enfermedad y de la fisiología y bioquímica del patógeno (Arie *et al.*, 1998).

Si esta exoPG es o no un factor determinante en la especificidad forma especial-hospedador y en el desarrollo de los síntomas, todavía no está claro. En nuestro caso, los experimentos que hemos realizado con anticuerpos parece hablar a favor de la implicación de la exoPG en la patogénesis, ya que esta se expresa en planta infectada. La exoPG parece ser una de las enzimas implicadas en la patogénesis, pero

probablemente no es la única responsable, como hemos comentado, es un mecanismo muy complejo en el que estarán implicadas además otras enzimas.

Estudios posteriores con la sonda obtenida, nos ayudarán a aportar más evidencias. La existencia presumiblemente de una única copia por genoma de este gen es un buen hallazgo y constituirá un buen candidato para la interrupción génica y poder así evaluar la importancia en el desarrollo de los síntomas de la exoPG.

CONCLUSIONES

- 1.- La actividad poligalacturonasa se induce por la presencia en el medio de cultivo de ácido galacturónico, ácido poligalacturónico, pectina de manzana, y extractos de paredes de tomate. El ácido galacturónico produce una inhibición tanto del crecimiento como de la actividad cuando se añade al medio a una concentración superior al 1%. No se ha detectado actividad alguna en cultivos con glucosa como fuente de carbono, incluso en presencia de inductor.
- 2.- FORL produce, cuando crece sobre fuentes de carbono inductoras, varias isoformas con actividad pectinesterasa o poligalacturonasa en un amplio rango de pH. La mayor variedad de poligalacturonasas se produce en los extractos sobre pectina de manzana y la mayor variedad de esterases en el crecimiento sobre paredes de tomate.
- 3.- En los primeros momentos del crecimiento, FORL produce una mezcla de poligalacturonasas tanto de tipo endo como exoPG, en todas las fuentes de carbono inductoras estudiadas, excepto en poligalacturónico que produce exclusivamente endoPGs. Posteriormente produce exclusivamente exoPGs cuando los inductores son pectina y paredes de tomate, exclusivamente endoPGs cuando el inductor es poligalacturónico y una mezcla de ambas cuando el inductor es galacturónico.
- 4.- Se ha diseñado un método para purificar a homogeneidad la poligalacturonasa mayoritaria de las producidas el día 6 de crecimiento sobre pectina de manzana, este método permite purificar la enzima 32 veces con un rendimiento del 8,6 % .
- 5.- La caracterización de la enzima permite asignarle una masa molecular aproximada de 68 kDa. Se trata de una exopoligalacturonasa, con un pI de 6,6, un pH óptimo de 5,6 y una temperatura óptima de 55- 60 °C. La exoPG es un glicoproteína con un alto grado de glicosilación. Todos los azúcares están unidos a la proteína mediante uniones N-glicosídicas. La masa molecular de la proteína desglicosilada es aproximadamente 50 kDa.
- 6.- La exoPG es capaz de degradar tanto el poligalacturónico como el trigalacturónico y digalacturónico con unas K_m respectivas de 0,64, 0,99 y 1,17 y unas V_{max} de $1,84 \times 10^{-3}$, $1,9 \times 10^{-3}$ y $2,06 \times 10^{-3}$ respectivamente.

7.- El amino terminal no presenta homologías con otros de exo o endoPGs publicados en la bibliografía. Gracias a la secuencia amino y a la de un péptido interno de la proteína se ha podido obtener una sonda para la exoPG. El fragmento obtenido tiene 753 pb, tres intrones y 3 sitios de glicosilación y presenta homología con las únicas secuencias de exoPGs secuenciadas.

8.- Se han obtenidos anticuerpos policlonales frente a la exoPG mediante los cuales hemos podido detectar la proteína en raíz de infectada.

9.- Las proteínas inhibidoras de las poligalactonasas (PGIPs) ensayadas son capaces de inhibir a la exoPG, aunque se necesitan cantidades superiores que las utilizadas para inhibir a endoPGs.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Goukh, A.A. y Labavitch, J.M.** (1983) The *in vitro* role of "Bartlett" pear fruit polygalacturonase inhibitors. *Physiol. Plant. Pathol.* **23**: 123-135.
- Aguilar, G., Trejo, B.A., García, J.M., Huitrón, C.** (1991). Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* **37**:912-917.
- Albersheim, P. y Anderson, A.J.** (1971). Protein from plant cell wall inhibit polygalacturonase secreted by plant pathogen. *Proceeding of the National Academy of Science, USA.* **68**: 1815-1819.
- Albersheim, P.** (1976). The primary cell wall. En: Plant Biochemistry. Bonner y Varner (eds). Academic Press. Nueva York. Pags: 225-273.
- Alfonso, C., Del Amo, F., Nuero, O. y Reyes, F.** (1992). Physiological and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* race 2 for its biocontrol by nonpathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**: 169-174.
- Altscul, Stephen, F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic. Acids. Res.* **25**: 3389-3402.
- Anderson., A.J., y Albersheim, P.** (1972). Host pathogen interactions V. Comparison of the abilities of protein isolates from three varieties of *Phaseolus vulgaris* to inhibit the endopolygalacturonase secreted by three races of *Colletotrchum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.* **2**: 339-346.
- Arie, T., Hayashi, Y., Yoneyama, K., Nagatani, A., Furuya, M. y Yamaguchi, I.** (1995). Detection of *fusarium* spp in plant with monoclonal antibody. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **61**: 311-317.
- Armstrong, G.M. y Armstrong, J.K.** (1981). Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En: "*Fusarium*: diseases, biology and taxonomy". Nelson, Tousson y Cook (eds). University Park and London. Pennsylvania State. Pags: 391-399.
- Aspinall, G.O.** (1981). En: "Plant Carbohidrates. II. Extracellular Carbohidrates". Tanner y Loewus (eds). Springer-Verlag. Berlin y New York. Pags: 554.
- Ayers, W.A., Papavizas, G.C. y Diem, A.F.** (1966). Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology.* **56**: 1006-1011.
- Bacic, A., Harris, P.J. y Stone, B.A.** (1988). Structure and function of plant cell walls. En: "The biochemistry of plants". Vol:14. Priess (ed). Academic Press. New York. Pags:297-371.
- Barrett, A.T. y Northcote, D.H.** (1965). Apple fruit pectic substances. *Biochem. J.* **94**: 617-627.

- Barthe, J.P., Cantenys, D. y Touze, A.** (1981). Purification and characterization of two polygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuhianum*. *Phytopathol. Zeitschr.* **100**: 162-171.
- Bateman, D.F.** (1966). Hydrolytic and trans-eliminative degradation of pectic substances by extracellular enzymes of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. *Phytopathology*. **56**:238-244.
- Bateman, D.F.** (1972). The polygalacturonase complex produced by *Sclerotium rolfsii*. *Physiol. Plant Pathol.* **2**:175-184.
- Bateman, D.F.** (1976). Plant cell wall hydrolysis by pathogens. En: "Biochemical aspects of plant-parasite relationships. Friend y Threlfall (eds). Academic Press. London Pags:79-103.
- Bateman, D.F. y Basham, H.G.** (1976). Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. En: "Encyclopedia of plant physiology, New series, Vol:4, Physiological plant pathology". Heitefuss y Williams (eds). Springer-Verlag, Berlin. Pags: 316-355.
- Beckmam, C.H.** (1987). The nature of wilt diseases of plants. American Phytopathological Society Press (Ed). St. Paul, Minnesota. Pag:175.
- Benhamou, N., Chamberland, H., Ouellette, G.B. y Pauzé, F.J.** (1988). Detection of galactose in two fungi causing wilt diseases and their plant host tissues by means of gold- complexed *Ricinus communis* agglutinin I. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **32**: 249-266.
- Benhamou, N., Grenier, J., Asselin, A., Legrand, M.** (1989 b). Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. *Plant Cell.* **1**: 1209-1221.
- Benhamou, N., Chamberland, H. and Pauzé, F.J.** (1990 a). Implication of pectic components in cell surface interactions between tomato roots cells and *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. A cytochemical study by means of a lectin with polygalacturonic acid-binding specificity. *Plant Physiol.* **92**: 995-1003.
- Benhamou, N., Joosten, M.H.A.J. and De Wit, J.G.M.** (1990 b). Subcellular localization of chitinase and its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Plant Physiol.* **92**: 1108-1120.
- Benhamou, N., Mazau, D. y Esquerre-Tugaye, M.T.** (1990 c). Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins in tomato roots cells infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*: study of a compatible interaction. *Mol. Plant Pathol.* **80** (2): 163-173.
- Benhamou, N., Mazau, D. Grenier, J. y Esquerre-Tugaye, M.T.** (1991). Time-course of the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in root cells

- susceptible and resistant tomato plant infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Planta*. **184**:196-202.
- Blanco, P., Siero, C., Díaz, A. y Villa, T.G.** (1994). Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **40**: 974-977.
- Bodenmann, J., Heiniger, U. y Hohl, H.R.** (1985). Extracellular enzymes of *Phitophthora infestans*: endo-cellulase, β -glucosidases, and β -1,3-glucanases. *Can. J. Microbiol.* **31**:75-82.
- Bonhot, D.** (1981). Some aspect of the pathogenic potential in formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* on cucurbitaceae. En: "*Fusarium*: diseases, biology and taxonomy". Nelson, Tousson y Cook (eds). University Park and London. Pennsylvania State. Pags: 318-326.
- Booth, C.** (1971). The species of *Fusarium*. En: "The genus *Fusarium*". Commonwealth Mycology Institute (Ed). Kew, Surrey. Pags: 130-155.
- Booth, C.** (1978). Presidential address. Do you believe in genera?. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **71** (1): 1-9.
- Booth, C.** (1984). The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. En: "The applied mycology of *Fusarium*". Moss and Smith (eds). Cambridge University press. London. Pags:1-13.
- Bowles, D.J.** (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Ann. Rev. Biochem.* **59**: 873-907.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brammall, R.A. y Higgins, V.J.** (1988 a). A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible or resistant to *Fusarium* crown and root rot disease. *Can. J. Bot.* **66**: 915-925.
- Brett, C. y Waldron, K.** (1990). Physiology and biochemistry of plant cell walls. Black y Chapman (eds). Unwin Hyman. London.
- Brown, A.E.** (1984). Relationship of endopolygalacturonase inhibitor activity to the rate of fungal rot development in apple fruits. *Phytopathol.* **111**: 122-132.
- Brown, A.E. y Adikaram, N.K.B.** (1982) The differential inhibition of pectic enzymes from *Glomerella cingulata* and *Botrytis cinerea* by a cell wall protein from *Capsicum annum* fruit. *Phytopathol.* **105**: 27-38.

- Bruce, R.J. y West, C.A.** (1982). Elicitation of casbene synthetase activity in castor bean. The role of pectic fragments of the plant cell wall in elicitation by fungal endopolygalacturonase. *Plant Physiol.* **69**: 1181-1188.
- Bucheli, P., Doares, S.H., Albersheim, P. y Darvill, A.** (1990). Partial purification and characterization of heat-labile molecules secreted by the rice blast pathogen that solubilize plant cell wall fragments that kill plant cells. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **36**: 159-173.
- Burges, L.W.** (1981). General ecology of the *Fusaria*. En: "*Fusarium*: diseases, biology and taxonomy". Nelson, Tousson y Cook (eds). University Park and London. Pennsylvania State. Pags:225-235.
- Bussink, H., Buxon, F., Fraaye, B., De Graaff, y Visser, J.** (1992). The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur. J. Biochem.* **208**:83-90.
- Cappellini, R.A.** (1966). Growth and polygalacturonase production by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology.* **56**: 734-737.
- Caprari, C., Bergmann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., Cervone, F. y De Lorenzo, G.** (1993a). *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **43**: 453-462.
- Caprari, C., Richter, A., Bergman, C., Lo Cicero, S., Salvi, G., Cervone, F., De Lorenzo, G.** (1993b). Cloning and characterization of a gene encoding the the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Mycol. Res.* **97**: 497-505.
- Carpita, N.C. y Gibeaut, D.M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during the growth. *Plant. J.* **3** (1): 1-30.
- Carder, J.H., Hignett, R.C. y Swinburne, T.R.** (1987). Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their *in vitro* secretion of cell-wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **31**: 441-452.
- Cervone, F., Anderbahn, T., Coutts, R.H.A. y Wood, R.K.S.** (1981). Effects of French bean tissue and leaf protoplasts on *Colletotrichum lindemuthianum* polygalacturonase. *Phytopathologische Zeitschrift.* **102**: 238-246.
- Cervone, F., De Lorenzo, G., Salvi, G. y Camardella, L.** (1986b) Molecular evolution of fungal polygalacturonase. En: "Biology and molecular biology of plant-pathogenic interactions. Bailey (ed). NATO ASI series. Vol H1. Springer-Verlag. Berlin. Pags: 385-392.
- Cervone, F., de Lorenzo, G., Pressey, R; Darvill, A y Albersheim, P.** (1987). Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **85**:631-637.

- Cervone, F., Castoria, R., Spanu, P. y Bofante-Fasolo, P. (1988). Pectinolytic activity in some ericoid mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **91**: 537-539.
- Cervone, F., De Lorenzo, G., Pressey, R., Darvill, A.G. y Albersheim, P. (1990). Can *Phaseolus* PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants?. *Phytochemistry*. **29**: 447-449.
- Chamberland, H., Charest, P.M., Ouellette, G.B. y Pauzé, F.J. (1985). Chitinase-gold complex used to localize chitin ultrastructurally in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, compared with a chitin specific gold-conjugated lectin. *Histochem. J.* **17**: 313-321.
- Chamberland, H., Benhamou, N., Ouellette, G.B. y Pauzé, F.J. (1989). Cytochemical detection of saccharide residues in paramural bodies formed in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**: 131-146.
- Charest, P.M., Ouellette, G.B. y Pauzé, F.J. (1984). Cytological observations of early infection process by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* in tomato plants. *Can. J. Bot.* **62**: 1232-1244.
- Chen, J. y Varner, J.E. (1985). Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline rich 33 kDa protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 4399-4403.
- Clay, R.P., Bergmann, W. y Fuller, M.S. (1997). Isolation and characterization of an endopolygalacturonase from *Cochiobolus sativus* and a cytological study of fungal penetration of barley. *Phytopathology*. **87**: 1148-1159.
- Collmer, A. y Keen, N.T. (1986). The role of pectin enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409.
- Condit, C.M. y Meagher, R.B. (1986). A gene encoding a nivel rich glycine structural protein of petunia. *Nature*. **323**: 178-181.
- Cooper, R.M. y Wood, R.K.S. (1975). Regulation of synthesis of extracellular cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.* **5**: 135-156.
- Cooper, R.M., Rankin, B. y Wood, R.K.S. (1978). Cell wall degrading enzymes of vascular wilt fungi. II. Properties and mode of action of polysaccharidases of *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.* **13**: 101-134.
- Cooper, R.M. (1983). The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cells walls by parasites. En "Biochemical plant pathology" Callow, Wiley y Sons (eds). N.Y. Pags:101-135

- Cooper, R.M.** (1984). The role of cell wall degrading enzymes in infection and damage. En: "Plant diseases: infection, damage and loss" Wood y Jellis (eds). Backwell Scientific Pub. Oxford. Pags: 13-27.
- Cooper, R.M.** (1987). Use of mutants in exploring depolymerases as determinants of pathogenicity. En: "Genetics and plant pathogenesis". Day y Jellis (eds). Oxford. Pags: 261-281.
- Cooper, R.M., Longman, D., Campbell, A., Henry, M. y Lees, P.E.** (1988). Enzymic adaptation of cereal pathogens to the monocotyledonous primary wall. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **32**: 33-47.
- Couteaudier, Y., Alabouette, C. y Louvet, J.** (1984). Necrose du clochet et pourriture des racines de tomate causées par un *Fusarium oxysporum*. *Agronomie.* **4** (2): 211.
- Cruickshank, R.H.** (1983). Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **80**: 117-119.
- Darvill, J.E., McNeil, M., Darvill, A.G. y Albersheim, P.** (1980). Structure of plant cell walls XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* **66**: 1135-1139.
- Davis, K.R., Lyon, G.D., Darvill, A.G. y Albersheim, P.** (1984). Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexins accumulation by releasing plant cell fragments. Host pathogen interactions. XXV. *Plant Physiol.* **74**: 52-60.
- Davis, K.R., Darvill, A.G., Albersheim, P. y Dell, A.** (1986) Host-Pathogen interactions. XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. *Plant Physiol.* **80**: 568-577.
- Dean, R.A. y Timberlake, W.E.** (1989). Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (*PelA*). *Plant Cell.* **1**: 225-75-284.
- De Cal, A., Pascual, S y Melgarejo, P.** (1997). A rapid method for assessing the biological control potential of *Penicillium oxalicum* against *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Pathol.* **46**: 699-707.
- De Cal, A., Pascual, S y Melgarejo, P.** (1997). Infectivity of chlamydospores vs microconidia of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* on tomato. *J. Phytopathol.* **145**: 231-233.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA miniprep: a version. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19-21.
- De Lorenzo, G., Salvi, G., Degrá, R., D'Ovidio, R. y Cervone, F.** (1987). Induction of extracellular polygalacturonase and its mRNA in the phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3365-3373.

- De Lorenzo, G., Ranucci, A., Bellicampi, D., Salvi, G. y Cervone, F. (1987). Elicitation of phenylalanine ammonia-lyase in *Daucus carota* by oligogalacturonides released from sodium polypectate by homogenous polygalacturonase. *Plant Sci.* **51**:147-150.
- De Lorenzo, G., Ito, Y., D' Ovidio, R., Cervone, F., Albersheim, P. y Darvill, A.G. (1990). Host-pathogen interaction XXXVII. Abilities of the polygalacturonase inhibiting proteins from four cultivars of *Phaseolus vulgaris* to inhibit the endopolygalacturonase from three races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **36**: 421-435.
- De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellicampi, D. y Cervone, F. (1996). Fungal invasion enzymes and their inhibition. En: "Mycota". Carroll y Tudzinky (eds). Springer-Verlag. Berlin. Pags:
- Deighton, F.C., Stevenson, J.A. y Cummins, G.B. (1962). Formae speciales and the code. *Taxon.* **11**: 70-71.
- Desiderio, A., Aracri, B., Leckie, F., Mattei, B., Salvi, G., Tigelaar, H., Van Roekel, J.S.C., Baulcombe, D.C., Melchers, L.S., De Lorenzo, G. y Cervone, F. (1997). Polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10** (7): 852-860.
- Di Pietro, A. y Roncero, M.I.G. (1996). Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: Purification, characterization and production during infection of tomato plants. *Phytopathol.* **86** (12):1324-1329.
- Di Pietro, A. y Roncero, M.I.G. (1996). Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **145**: 295-299.
- English, P.D., Maglothlin, A., Keegstra, K. y Albersheim, P. (1972). A cell wall degrading endo-PG secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Physiol.* **49**: 293-298.
- Esquerré-Tugayé, M.T., Lafitte, C., Mazau, D., Toppan, A. y Touze, A. (1979). Cell surfaces in plant-microorganism interactions II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiol.* **64**: 320-326.
- Farmer, E.E. y Helgeson, J.P. (1987). An extracellular protein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is associated with stress metabolite accumulation in tobacco callus. *Plant Physiol.* **85**: 733-740.
- Favaron, F., Alghisi, P., Marciano, P. y Magro, P. (1988) Polygalacturonase isoenzymes and oxalic acid produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean hypocotyls as elicitors of glyceollin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **33**: 385-395.

- Fernández, N., Patiño, B. y Vázquez, C.** (1993). Pectin degrading enzymes secreted by six isolates of *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* **97** (4): 461-466.
- Fielding, A.H.** (1981). Natural inhibitors of fungal polygalacturonases in infected fruits. *J. Gen. Microbiol.* **123**: 377-381.
- Fisher, M.L., Anderson, A.J. y Albersheim, P.** (1973). Host-Pathogen interactions VI. A single plant protein efficiently inhibits endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Aspergillus niger*. *Plant Physiol.* **51**:489-491.
- Flor, H.H.** (1956). The complementary genic system in flax and flax rust . *Adv. In. Gen.* **8**:29-54.
- Forster, H., Rasched, I.** (1985) Purification and characterization of extracellular pectinesterases from *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* **77**: 109-112.
- Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P., Fevre, M.** (1995). Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Gen.* **29**: 96-99.
- Fraissinet-Tachet, L. y Fevre, M.** (1996). Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Microbiol.* **33**- 49-53.
- Fries, E.** (1821). *Systema Mycologicum*. 1, XLI. Introducción.
- Fogarty, W.M. y Kelly, C.T.** (1983). En: "Microbial enzymes and biotechnology". Fogarty (Ed). Applied Science Publishers. London y New York. Pags: 131-182.
- Fuchs, Y., Saxena, A., Gamble, H.R. y Anderson, J.D.** (1989) Ethylene biosynthesis-inducing protein from cellulysin is an endoxylanase. *Plant Physiol.* **89**: 138-143.
- García Maceira, F., Di Pietro, A. y Roncero, M.I.G.** (1997). Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 37-43.
- Geigy, J.R.** (1965). Tablas Científicas-Documenta Geigy. Basilea. Suiza.
- Gordon, W.L.** (1965). Pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Bot.* **43** (11): 1309-1318.
- Grog, A., Posterl, W. y Westermeier, R.** (1980). Electrophoresis'79. Radola, B.J. (ed). Walter de gruyter and Co. New York.
- Guevara, M.A., González-Jaén, M.T. y Estévez, P.** (1997). Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici*.

regulation of their synthesis by galacturonic acid. *Can. J. Microbiol.* **43**: 245-253.

Hahn, M.G., Bucheli, P., Cervone, F., Doares, S.H., O'Neill, R.A., Darvill, A. Y Albersheim, P. (1989). Roles of cell wall constituents in plant pathogen interactions. En: "Plant microbe interactions. Molecular genetics and perspectives". Vol.3. Kosuge y Nester (eds). McGraw Hill Publishing Co. New York. Pags: 131-181.

He, S.Y. y Collmer, A. (1990). Molecular cloning nucleotide sequence and marker exchange mutagenesis of the exo-poly- α -D-galacturonidase encoding *pehX* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* **172**:4988-4995.

Hisamatsu, H., Impallomeni, G., York, W.s., Albersheim, P. and Darvill, A.G. (1991). A new undecasaccharide subunit of xyloglucans with two α -L-fucosyl residues. *Carbohydr. Res.* **211**:117-129.

Hoffman, R.M. y Turner, J.G. (1982). Partial purification of protein from pea leaflets that inhibit *Aschochyta pisi* endopolygalacturonase. *Physiol. Plant. Pathol.* **20**: 173-187.

Hoffman, R.M. y Turner, J.G. (1984). Occurrence and specificity of an endopolygalacturonase inhibitor in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant Pathol.* **24**: 49-59.

Hoj, P.B. y Fincher, G.B. (1995). Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases. *Plant. J.* **7**: 367-379.

Hong, J.C., Nagao, R.T. y Key, J.L. (1987). Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein gene isolated from soybean. *J. Biol. Chem.* **262**: 8367-8376.

Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H. y Money, N.P. (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 11281-11284.

Hsi, K.L., Chen, L., Hawke, D.H., Zieske, L.R. y Yuan. P.M. (1991). A general approach of characterizing glycosylation sites of protein. *Anal. Biochem.* **198**: 680-685.

Hsu, S.C., y Lockwood, J.L. (1973). Chlamydospore formation in *Fusarium* in sterile salt solutions. *Phytopathol.* **68**: 1679-1680.

Huang, Q. Y Allen, C. (1997). An exo-poly- α -D-Galacturonosidase, PehB, is required for the wild-Type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **179** (23): 7396-7378.

- Hubbard, J.P., Williams, J.D., Niles, R.M. y Mount, M.S. (1978). The relation between glucose repression of an endopolygalacturonate trans-eliminase and adenosine 3'5'-cyclic monophosphate levels in *Erwinia carotovora*. *Phytopathology*. **68**: 95-99.
- Jansen, E.F. y McDonnell, L.R. (1945). Influence of methoxil content of pectic substances on the actions of polygalacturonase. *Arch. Biochem. Biophys.* **8**: 97-112.
- Jarvis, W.R. y Thorpè, H.J. (1976). Susceptibility of *Lycopersicom* species and hybrids to the foot and root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant. Dis. Rev.* **60**: 1027-1031.
- Jarvis, W.R. y Shoemaker, R.A. (1978). Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathol.* **68**: 1679-1680.
- Jarvis, M.C. (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell Environ.* **7**:153-164.
- Jones, T.M., Anderson, A.J. y Albersheim, P. (1972). Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.* **2**: 153-166.
- Jones, J.B., Stall, R.E. y Zitter, T.A. (1991). "Fusarium crown and root rot" . En: Compendium of tomato diseases. Jones, Stall y Zitter (eds). APS press, St. Paul, Minnessota, U.S.A. pag-14.
- Kaji, A. y Okada, T. (1969). Purification and properties of an unusually acid stable endopolygalacturonase produced by *Corticium rolfsii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **131**: 203-209.
- Katan, T., Zamir, D., Sarfatti, M. y Katan, J. (1991). Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Phytopathology*. **81**(3): 255-262.
- Karr, A.L. y Albersheim, P. (1970). Polysaccharide-degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a "wall-modifying enzyme". *Plant Physiol.* **46**:69-80.
- Kester, H.C.M., Kusters-Van Someren, M.A., Müller, Y. y Visser, J. (1996). Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. *Eur. J. Biochem.* **240**: 738-746.
- Keon, J.P.R., Waksman, G. y Bailey, J.A. (1990). A comparison of the biochemical and physiological properties of a polygalacturonase from two races of *Colletotichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37**: 193-206.

- Knogge, W.** (1996). Fungal infections of plants. *The plant cell*. **8**: 1711-1722.
- Kollar, A.** (1994). Characterization of Specific induction, activity, and isoenzyme polymorphism of extracellular cellulases from *Venturia inaequalis* detected *in vitro* and on the host plant. *Mol. Plant-Microbe interact.* **7**: 603-611.
- Kollar, A.** (1998). Characterization of an endopolygalacturonase produced by the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*. *Mycol. Res.* **102** (3): 313-319.
- Koller, A y Neukom, H.** (1969). Untersuchungen über den Abbaumechanismus einer gereinigten polygalakturonase aus *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* **7**: 485-489.
- Krikun, J., Nachmias, A., Cohn, R. y Ahakintor, L.** (1982). The occurrence of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Israel. *Phytoparasitica*. **10**: 113-115.
- Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L. y Kubicek-Pranz.** (1993). The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 90-99.
- Kuninaga, S y Yokosawa, R.** (1991). Determination of the taxonomic status of tomato crown and root rot isolates in *Fusarium oxysporum* by DNA homology. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **57**: 9-16.
- Kurowski, W.M. y Dunleavy, J.A.** (1976). Pectinase production by bacteria associated with improved preservative permeability in sitka spruce. Synthesis and secretion of polygalacturonate lyase by *Cytophaga jonhsonii*. *J. Appl. Bacteriol.* **41**: 119-128.
- Laemmli, M.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*. **227**: 680-685.
- Laffite, C., Barthe, J.P., Montillet, J.L. y Touze, A.** (1984). Glycoprotein inhibitors of *Colletotrichum lindemuthianum* endopolygalacturonase in near isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* resistant and susceptible to the anthracnose. *Physiol. Plant Pathol.* **25**: 39-53.
- Lamport, D.T.A.** (1986). The primary cell wall: a new model. En: "Cellulose: structure, modification and hydrolysis". Young and Rowel (eds). New York. pp:77-90.
- Lau, J.M., McNeil, M., Darvill, A.G. y Albersheim, P.** (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr. Res.* **137**: 111-125.
- Leary, J.V. y Endo, R.M.** (1971). *Fusarium*-induced by root of staked tomatoes (abstract). *Phytopathol.* **61**: 900.

- Leone, G y Van Den Heuvel, J. (1987). Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* **65**:2133-2141.
- Lei, S.P., Lin, H.C., Heffernan, L. y Wilcox, G. (1985). Evidence that polygalacturonase is a virulence determinat in *Erwinia caratovora*. *J.Bacteriol.* **164**(2): 831-835.
- Liddell, C.M. (1991). Recent advances in *Fusarium* systematics. *Phytopathol.* **81** (9): 1044.
- Link, J.H.F. (1809). Observations in *Ordines Plantarum Naturales*. *Nag. Ges. Naturforsch. Freunde* 3:10. Berlin.
- Lyon, G.D., Smith, K.J. y Heilbronn, J. (1986). The calcium requirement of polygalacturonic acid lyases produced by *Erwinia* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **2**: 127-129.
- Magro, P., Di Lenna, P., Marciano, P. y Pallavicini, C. (1980). Variability of polygalacturonase and protein isoelectric focusing patterns in *Botrytis cinerea* isolates. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 105-109.
- Malathrakis, N.E. (1985). Tomato crow and root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* in Greece. *Plant Pathol.* **33**: 438-439.
- Maldonado, M.C., Strasser de Saad, A.M. y Callieri, D. (1989). Catabolite repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger*. *Curr. Microbiol.* **18** (5): 303-306.
- Mankarios, A.T. y Friend, J. (1980). Polysaccharide degrading enzymes of *Botrytis allii* and *Sclerotium cepivorum*: Enzyme production in culture and the effect of the enzymes on isolated onion cell walls. *Physiol. Plant Pathol.* **17**: 93-104.
- Marciano, P., Di Lenna, P. y Magro, P. (1982). Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* *in vivo* and *in vitro*. *Physiol. Plant Pathol.* **20**: 201-212.
- Martel, M.B., Letoublon, R. y Fevre, M. (1996). Purification of endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*: multiplicity of the complex enzyme system. *Curr. Microbiol.* **33**: 243-248.
- Martel, M.B., Letoublon, R. y Fevre, M. (1998). Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**: 133-138

- Martínez, M.J., Alconada, M.T., Guillen, F., Vázquez, C. y Reyes, F.** (1991). Pectic activities from *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*: purification and characterization of an exopoligalacturonase. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**: 145-150.
- McCann, M.C., Wells, B. y Roberts, K.** (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J. Cell Sci.* **96**:323-334.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. y Albersheim, P.** (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 625-663.
- Miller, L. y Macmillan, J.D.** (1971). Purification and pattern action of pectinesterase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. *Biochemistry*. **10**: 570-576.
- Moran, F., Nasuno, S. y Starr, M.P.** (1968). Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans-eliminases of *Erwinia carotovora*. *Arch. Biochem. Biophys.* **123**: 298-306.
- Nelson, N.** (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method to the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
- Nozaki, K., Miyairi, K., Hozumi, S., Fukui, Y. y Okuno, T.** (1997). Novel exopolygalacturonases produced by *Alternaria mali*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (1):75-80.
- Pagel, W., Heitefuss, R.** (1990). Enzyme activities in soft rot pathogenesis of potato tubers: effects of calcium, pH, and degree of pectin esterification on the activities of polygalacturonase and pectate lyase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37**: 9-25.
- Pardo, C., Lapeña, M.A., Gacto, M.** (1991). Purification and characterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. *Can. J. Microbiol.* **37**: 974-977.
- Patiño, B; Posada, M.L., González-Jaén, M.T. y Vázquez, C.** (1997). The course of pectin degradation by polygalacturonases from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Microbios.* **91**: 47-54.
- Patiño, B; Posada, M.L., González-Jaén, M.T., Martínez del Pozo, A y Vázquez, C.** (1997). Control of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 1084-1090
- Pérez-Artés, E., Tena, M.** (1990). Purification and characterization of pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37**: 107-124.
- Pippen, E.L., McCready, R.M. y Owens, H.S.** (1950). Gelation properties of partially acetylated pectins. *J. Am. Chem. Soc.* **72**: 813-816.

- Polizeli, M.L.T.M., Jorge, J.A. y Terenzi, H.F.** (1991). Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1815-1823.
- Posada, M.L.** (1998). Control genético de la exopoligalacturonasa en *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL). IX Congreso Nacional de Fitopatología. Salamanca.
- Powell, D.A., Morris, E.R., Gidley, M.J. y Rees, D.A.** (1982). Conformations and interactions of pectins II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *J. Mol. Biol.* **155**: 517-531.
- Price, D.** (1984). *Fusarium* and plant pathology: the reservoir of infection. En: The applied mycology of *Fusarium*. Moss and Smith (eds). Cambridge University Press. London. Pags.71-93.
- Rees, D.A.** (1977). Polysaccharide shapes. Chapman y Hall (Ed). London.
- Rexová-Benková, L. y Markovic, O.** (1976). Pectic enzymes. *Adv. Carb. Chem. y Biochem.* **33**: 325-385.
- Reymond, P., Deleage, G., Rascle, C. y Fevre, M.** (1994). Cloning and sequence analysis of a polygalacturonase encoding genes from the phytopathogenic fungus *S. sclerotiorum*. *Gene* **146**: 233-237.
- Ried, J.L. y Collmer, A.** (1986). Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*, and *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52** (2): 305-310.
- Ried, J.L. y Collmer, A.** (1988). Construction and characterization of an *Erwinia chrysanthemi* mutant with directed deletions in all of the pectate lyase structural genes. *Mol. Plant Microbe Interac.* **1**: 32-38.
- Riou, C., Freyssinet, G. y Fevre, M.** (1991). Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1478-1484.
- Riou, C., Fraissinet-Tachet, L., Freyssinet, G. y Fevre, M.** (1992). Secretion of pectic isoenzymes by *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 231-238.
- Roberts, D.A. y Boothroyd, C.W.** (1984). Vascular wilt diseases in plants. En: fundamentals of plant pathology (2nd edition). Freeman and company (Ed). New York. Pags 76-88.
- Robinson, D.G.** (1991). What is a plant cell?. The last word. *Plant cell.* **3**: 1145-1146.
- Robson, G.D., Khun, P.J. y Trinci, A.P.J.** (1989). Effect of vanidamycin A on the production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2709-2715.

- Rowe, R.C.** (1980). Comparative pathogenicity and host ranges of *Fusarium oxysporum* isolates causing crown and root rot of greenhouse and field-grown tomatoes in North America and Japan. *Phytopathol.* **65**: 726-727.
- Ryan, C.A.** (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **28**:425-449.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor ed. N.Y.
- Sánchez, L.E., Endo, R.M. y Leary J.V.** (1975). A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* causing crown and root rot of tomato. *Phytopathol.* **65**: 726-727.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. y Vandamme, E.J.** (1993). Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* **39**: 213-294.
- Sato, R y Araki, T.** (1974). On the tomato root rot and disease occurring in Vinyl-house conditions of southern. *Hokkaido Rep. Soc. Plant Prot. North Japan.* **25**: 5-13.
- Scala, F., Cristinzio, G., Marziano, F. y Noviello, C.** (1981). Endopolygalacturonase zymograms of *Fusarium* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **77** (3). 587-591.
- Schell, M.A., Roberts, D.P. y Denny, T.P.** (1988). Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* **170** (10): 4501-4508.
- Scott-Craig, J.S., Panaccione, D.G., Cervone, F. y Walton, J.D.** (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell.* **2**: 1191-1200.
- Scott-Craig, J.S., Cheng, Y.Q., Cervone, F., De Lorenzo, G., Pitkin, J.W. y Walton, J.D.** (1998). Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (4): 1497-1503.
- Shibata, Y. y Nisizawa, K.** (1965). Microheterogeneity of β -glucosidase in apricot emulsion. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**: 516-521.
- Siessere, V., Vieira Fonseca, M.J. y Said, S.** (1992). Extracellular polygalacturonases from *Penicillium frequentans*: separation and regulatory aspects. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1801-1805.
- Snyder, W.C.** (1969). Survival of *Fusarium* in soil. *Annales de phytopathologia.* **1**: 209-212.

- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**:19-23.
- Sonoda, R.M. (1976). The occurrence of *Fusarium* root rot of tomatoes in south Florida. *Plant.Dis. Rep.* **60**: 271-274.
- Sposato, P., Ahn, J.H. y Walton, J.D. (1995). Characterization and disruption of a gene in the maize pathogen *Cochliobolus carbonum* encoding a cellulase lacking a cellulose binding domain and hinge region. *Mol. Plant-Microbe interact.* **8**: 602-609.
- Stratilova, E., Markovic, O., Strovina, D., Rexova-Benkova, L y Jornvall, H. (1993). *Aspergillus* sp. polygalacturonase: multiplicity, divergence and structural patterns linking fungal, bacterial and plant polygalacturonases. *J. Prot. Chem.* **12**: 15-22.
- Tierney, M.L., Wiechart, J. y Puymers, D. (1988). Analysis of the expression of extensin and p33-related cell wall proteins in carrot and soybean. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 393-399.
- Tarentino, L.A. y Maley, F. (1974). Purification and properties of an endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* **249**: 811-817.
- Tello, J.C. y Lacasa, A. (1988). "La podredumbre del cuello y de las raíces", causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*lycopersicon esculentum* Mill.) españoles. *Bol. San. Veg. Plagas.* **14**: 307-312.
- Tello, J.C. (1989). *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitaria (fusariosis vasculares del tomate y clavel) y no parasitaria (tesis doctoral). Universidad Politécnica de Madrid. Madrid.
- Tenhaken, R. y Barz, W. (1991). Characterization of pectic enzymes from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. *Zeitsch. Naturforsch.* **46c**: 51-57.
- Trevelyan, W.E. y Harrison, J.S. (1952). Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* **50**: 298-302.
- Vance, C.P., Kirk, T.K. y Sherwood, R.T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**:259-288.
- Vázquez, C., Martínez, M.J., Lahoz, R. y Reyes, F. (1985). Inducción de distintas actividades pécticas del hongo *Alternaria alternata* durante su autólisis. *Microbiol. Españ.* **38**(1-2)53.
- Vázquez, C., Martínez, M.J., Lahoz, R. y Reyes, F. (1986). Effect of calcium and other methal ions on pectic activities from autolysed cultures of *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **37**: 227-220.

- Vázquez, C., Patiño, B. y Martínez, M.J. (1993). Purification and characterization of an exopolygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici*. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**: 191-196.
- Walker-Simmons, M., Hadwinger, L. y Ryan, C.A. (1983). Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pitasin in pea pods and the nutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem. Biophys. Res. Communications.* **110**: 194-199.
- Walton, J.D. (1994). Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* **104**:1113-1118.
- Wijesundera, R.L.C., Bailey, J.A. y Byrde, R.J.W. (1984). Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthianum* in culture and in infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 285-290.
- Wimborne, M.P. y Rickard, P.A.D. (1978). Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* cultured in controlled environments. *Biotechnol. Bioeng.* **20**:231-242.
- Yamamoto, I., Komada, H., Kuniyasu, K., Saito, M. y Ekuza, A. (1974). A new race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* inducing root rot of tomato. *Proc. Kansay plant prot. Soc. (Japan)*, **16**: 17-29.
- Zhu, J.K., Shi, J., Singh, U., Wyatt, S.E., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. y Carpita, N.C. (1993) enrichment of vitronectin- and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *Plant. J.* **3** (5): 637-645.

